



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS.
CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
“ISLA DE LA CARTUJA”.**



**DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ORGÁNICA**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE INOSITOL
FOSFOGLICANOS MEDIANTE RMN, MECÁNICA Y
DINÁMICA MOLECULAR.**

MEMORIA presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por

José Luis Muñoz Ponce
Sevilla, 2015

D. PEDRO MANUEL NIETO MESA, Científico Titular del C.S.I.C.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado: “ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE INOSITOL FOSFOGLICANOS MEDIANTE RMN, MECÁNICA Y DINÁMICA MOLECULAR” ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento, en el Grupo de Carbohidratos, en el Instituto de Investigaciones Químicas, del Centro de Investigaciones Científicas Isla de La Cartuja (Sevilla) durante los años académicos 1999-2000, 2000-2001, 2001-2002 y 2002-2003, constituyendo la Memoria que presenta el Lcdo. José Luis Muñoz Ponce para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, 28 de Septiembre de 2015

Director Tesis:

Fdo.: Pedro M. Nieto Mesa

Doctorando:

Fdo. José Luis Muñoz Ponce

Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo gracias a la ayuda de las becas predoctorales, que se enumeran a continuación:

Beca predoctoral del grupo Rademacher Group Limited (Octubre1999-Diciembre2000).

Beca para formación y especialización en líneas de investigación de interés para el sector industrial del CSIC (Enero 2001-Diciembre 2001).

Beca para formación y especialización en líneas de investigación de interés para el sector industrial del CSIC-I3P del CSIC (Febrero 2002-Enero 2003).

Beca Instituto “*Reina Sofía*” de la Fundación RENAL (Febrero 2003-Junio 2003).

"La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad".

Julio Verne.

"No creo que haya otra cualidad tan esencial para el éxito de cualquier tipo que la perseverancia. Supera a casi todo, incluso a la naturaleza".

John D. Rockefeller.

El actual trabajo que presento, se ha realizado en el Instituto de Investigaciones Químicas del Consejo Superior de Investigaciones Químicas, bajo la dirección del Investigador Científico, el Dr. Pedro Manuel Nieto Mesa. Han sido muchos años de tutela, dirección, apoyo y palabras de comprensión en los malos momentos y agradezco de todo corazón que no haya perdido la esperanza y la constancia, para que este proyecto conjunto pueda cerrarse con la consecución de mi tesis doctoral. Sé que ha luchado contra todo y todos, y que a veces los proyectos tienen un recorrido más corto del que querríamos, por eso te doy las gracias y por los buenos momentos y horas de RMN donde he podido aprender con uno de los grandes de este país.

No me gustaría olvidar a la gente que ocuparon un trocito de mi vida y a las que quiero expresar mi profundo y sincero agradecimiento:

Sin la ayuda de la financiación que recibí durante los años que realicé la parte experimental de la tesis, no hubiera podido existir, al menos impresa con mi nombre. Por eso y en primer lugar, agradecer al Profesor Manuel Martín Lomas, por buscarme y encontrarme en aquel laboratorio del CSIC en Madrid en 1999 cuando finalizaba mi Tesis de Licenciatura y ofrecerme la posibilidad de ir a un grupo especialista donde realizar la tesis. Estoy orgulloso de haber compartido grupo con una de las personas más prolíferas de este país, referencia de investigadores.

A las becas disfrutadas y a las instituciones públicas y privadas que posibilitaron esta tesis:

Beca predoctoral del grupo Rademacher Group Limited (Octubre 1999-Diciembre 2000). Beca para formación y especialización en líneas de investigación de interés para el sector industrial del CSIC (Enero 2001-Diciembre 2001). Beca para formación y especialización en líneas de investigación de interés para el sector industrial del CSIC-ISP del CSIC (Febrero 2002-Enero 2003). Beca Instituto "Reina Sofía" de la Fundación RENAL (Febrero 2003-Junio 2003).

A los tutores que con amabilidad aceptaron la tutela en la presente tesis doctoral del Programa Estudios Avanzados en Química; en primer lugar al Dr. José Fuentes Mota hasta la fecha de su jubilación y en el último año y con cierta premura el Dr. José Luis Jiménez Blanco, Profesor Titular Universidad en Universidad de Sevilla.

A los entonces Doctores y hoy en día pilares en diversas ramas de investigación y con cargos institucionales bien diferentes: Soledad Penedés, Julio Delgado, Luz Cadenas, Francisco Pinto, Javier Rojo, Eva Arce, Ricardo Pérez.

A los que fueron compañeros durante la realización de mi tesis con los que tantas aventuras, dichas y desdichas compartí: África, Ricardo, Oli, Paco, Niels, Javier Lopez, Julia, Sara, Juan Antonio, Jesús, Cristina, Belén, Félix, Stephan, Florence, M^a José, Marcelo, Mercedes, Tere, Lizeth, Natalia, José Luis de Paz, Rafael Ojeda, Silvia.

Mención especial con mucho cariño para mis “chicos de los espines orientados con el campo”, con los que pasé muchas horas de mi vida, debatiendo, discutiendo, ampliando conocimientos, realizándome como doctorando y aprendiendo: Dr. Franck Chevalier y Dr. Jesús Angulo Álvarez.

A mi familia, por el cariño.

A mis padres adoptivos, nunca la palabra suegros tuvo un significado tan grande y próximo, gracias por vuestra paciencia, apoyo infinito y demostración de afecto día a día, en los buenos y sobre todo en los malos momentos, y sabéis que también existieron en una tesis tan larga. Os debo mucho y nunca podré pagároslo.

A mi amor, Patricia Mora, un apoyo básico sin el que no hubiera podido resistir. Su confianza y palabras de ánimo, su alegría y positividad, su amor sin condiciones, hicieron de mi mejor persona e investigador. El motor de mi vida. Te quiero.

Cuando inicié la presente tesis no entraban ni en mis pensamientos y hoy en día son realidad de mi vida e indispensables, mis dos hijos: Israel y Cecilia, quienes con seguridad se aburrirán en la defensa de mi tesis, pero que el día de mañana agradecerán a buen seguro haber podido asistir. Son mi sangre y carne, y a ellos les pertenece todo lo que tengo y soy; una parte de esta tesis va por vosotros. También dedicar al aún non nato, aún tiene tiempo para que podamos explicarle que aportó su padre a la ciencia.

INDICE

PREFACIO

1.-INTRODUCCION

1.1.- INOSITOL DISTRIBUCCION, ACTIVIDAD Y SIGNIFICANCIA BIOLÓGICA. **Pag 5-6.**

1.2.- MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA. **Pag 7-11.**

1.2.1.-La cascada de fosforilación. *Pag 7-8.*

1.2.2.-La hipótesis del segundo mensajero. *Pag 8-10.*

1.2.3.-Inositolfosfoglicanos como segundos mensajeros: IPGs tipo A y tipo P. *Pag 10-11.*

1.3.- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE CARBOHIDRATOS.

Pag 11-26.

1.3.1.- Características estructurales de carbohidratos.

Pag 12-14.

1.3.2.- RMN de carbohidratos.

Pag 14-19.

1.3.3.- Modelado molecular de carbohidratos: métodos de campos de fuerzas.

Pag 19-26.

1.4.- OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL. **Pag 26-27.**

1.5.-BIBLIOGRAFIA. **Pag 28-32.**

2.- ESTUDIOS DE PSEUDODISACÁRIDOS MIMÉTICOS DE IPG.

2.1.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS. **Pag 35-38.**

2.2.- METODOLOGÍA **Pag 38-42.**

2.2.1.- Resonancia Magnética Nuclear. *Pag 38-39.*

2.2.2.- Cálculos teóricos de campos de fuerzas.

Pag 40-42.

2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION. **Pag 42-75.**

2.3.1.- Motivo estructural glucosamina α (1 \rightarrow 6) *mio*-inositol.

Pag 43-48.

2.3.2.- Motivo estructural glucosamina β (1-6) *mio*-inositol.

Pag 48-51.

INDICE

2.3.3.- Motivo estructural glucosamina α (1-6) <i>quiro</i> -inositol.	Pag 52-56.
2.3.4.- Motivo estructural glucosamina β (1-6) <i>quiro</i> -inositol.	Pag 57-59.
2.3.5.- Motivo estructural hexosamina α (1 \rightarrow 6) Pinitol	Pag 60-66.
2.3.6.- Motivo estructural hexosamina β (1 \rightarrow 6) pinitol.	Pag 66-70.
2.3.7.- Modelado Molecular de los grupos Hidroximetilo.	Pag 71-75.
2.4.- CONCLUSIONES.	Pag 75-78.
2.5.- BIBLIOGRAFIA.	Pag 79-83.
3.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE POTENCIALES INHIBIDORES DE PKA.	
3.1.- DISEÑO RACIONAL DE NUEVOS IPGs.	Pag 86-89.
3.2.- METODOLOGÍA	Pag 89-91.
3.2.1.- Resonancia Magnética Nuclear.	Pag 89
3.2.2.- Cálculos Teóricos.	Pag 89-91
3.3.- RESULTADOS Y DISCUSION.	Pag 91-120.
3.3.1.- Pseudodisacáridos fosfato.	Pag 91-97
3.3.2.- Pseudotrisacáridos no fosfatados.	Pag 97-105
3.3.4.- Pseudotrisacárido di-fosfato.	Pag 105-116
3.4.- ESTUDIO DE PROTONES HIDROXÍlicos POR RMN.	Pag 120-126.
3.5.- CONCLUSIONES	Pag 126-128.
3.6.- BIBLIOGRAFIA.	Pag 129-133.
4.- PARTE EXPERIMENTAL	
4.1.- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.	Pag 136-140.
4.2.- CALCULOS TEÓRICOS DE CAMPOS DE FUERZAS.	Pag 141-144.
APENDICE 1.- Estudio comparativo de las parametrizaciones para carbohidratos del campo de fuerzas AMBER.	Pag 145-146.
APENDICE 2.- Valoraciones ácido-base.	Pag 147-148.

CAPITULO 1

INTRODUCCION.

PREFACIO.

En enero de 1997 se firmó un convenio entre la empresa británica Hoëft-Rademacher Limited, que más tarde pasó a llamarse Rademacher Group Limited y luego Rodaris Pharmaceuticals, y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). La empresa se había creado en base a una serie de ideas y resultados experimentales publicados a lo largo de los años 1980 que parecían indicar la existencia de un nuevo mecanismo de señalización intracelular. Una considerable cantidad de evidencias experimentales apuntaban a la operatividad de este nuevo mecanismo en procesos de tanta trascendencia biomédica y tanta importancia económica como la transducción de la señal de la insulina. El principal objetivo de la nueva compañía era desarrollar y comercializar productos biológicamente activos basados en estas evidencias e hipótesis, y la finalidad del convenio desarrollar en los laboratorios del Grupo de Carbohidratos del CSIC en el Centro de la Isla de La Cartuja métodos y estrategias de síntesis química y análisis estructural que permitiesen luego a la compañía la síntesis de familias de compuestos y su estudio farmacológico.

El convenio estuvo vigente hasta enero de 2002. Durante esos cinco años se desarrolló en los laboratorios del Grupo en Sevilla una química, inicialmente basada en trabajos llevados a cabo en los laboratorios del Grupo en Madrid a lo largo de los 1980s, que ha abierto el camino hacia la síntesis de un considerable número de moléculas y el conocimiento de sus estructuras tridimensionales en solución. De acuerdo con las condiciones del convenio, los resultados obtenidos se fueron transfiriendo a la empresa y sólo algunos de ellos aparecieron publicados en la literatura química habitual. La mayor parte de esta propiedad intelectual, ahora convenientemente protegida, empieza a publicarse por los cauces usuales. Esta Tesis Doctoral y otras que están asimismo en los trámites de presentación y defensa, constituyen parte del trabajo básico realizado en el marco de este convenio de colaboración.

El planteamiento inicial de la compañía estuvo centrado en el desarrollo y la comercialización de productos que pudieran utilizarse en el tratamiento de enfermedades generadas como consecuencia de lo que se conoce como resistencia a la acción de la insulina. Esta resistencia se define como una condición en la que una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica muy por debajo de la normal y tiene como manifestaciones cardinales la hiperinsulinemia y la hiperglicemia. Las enfermedades resultantes incluyen la diabetes *mellitus* no dependiente de insulina (NIDDM), la obesidad, el síndrome policístico de ovario y las enfermedades isquémicas, todas ellas de considerable impacto económico y social en las sociedades industrializadas.

El planteamiento de nuestro laboratorio fue desarrollar una química que facilitara la elucidación del hipotético nuevo mecanismo de transducción intracelular y, al mismo tiempo, establecer en el Centro de la Isla de La Cartuja, inaugurado casi simultáneamente a la creación de la compañía, unas líneas de investigación básica orientada que, dentro de las mayores exigencias de rigor y profundidad, fuesen de suficiente interés y novedad como para ser íntegramente financiadas por el sector biofarmacéutico.

Sevilla, 2015

1.1.- INOSITOL DISTRIBUCIÓN, ACTIVIDAD Y SIGNIFICANCIA BIOLÓGICA.

Los ciclitoles son compuestos definidos como “cicloalcanos que presentan un hidroxilo en tres o más átomos de carbono”.¹ Aunque están estructural y biológicamente muy relacionados con los carbohidratos, generalmente no se consideran incluidos en estos. Los ciclitoles presentan funciones tan diversas como almacenamiento energético, intermedio metabólico, o señalización celular.² Los inositoles son los ciclitoles más abundantes en la naturaleza, de los que la mayor parte se encuentra como *mio*-inositol, una de las nueve formas estereoisómeras posibles (figura 1). Este aparece principalmente como *L-mio*-inositol-1-fosfato, su hexafofato (fitato) y formando parte de fosfolípidos. Otros inositoles que se encuentran en la naturaleza son el *L-qui*ro-inositol y el 1*L-qui*ro-inositol junto con esteres metílicos como 1*D*-1-*O*-metil-*qui*ro-inositol, 1*D*-3-*O*- metil-*qui*ro-inositol (*D*-pinitol), 1*L*-3-*O*-metil-*qui*ro-inositol (*L*-pinitol).

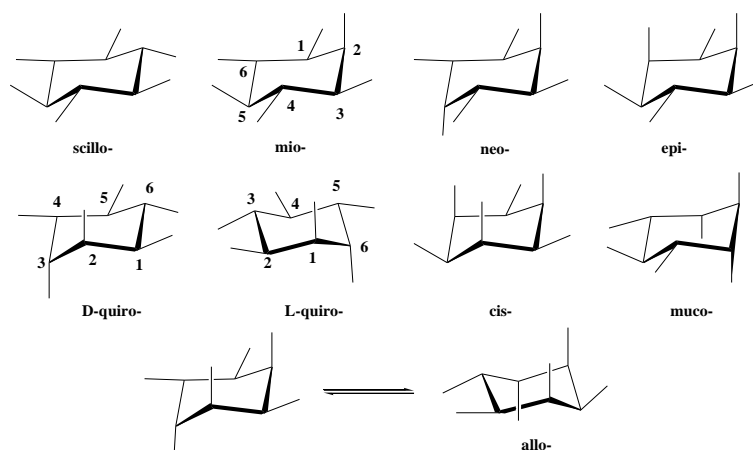


Figura 1. Representación de los estereoisómeros de inositol, sin incluir los OH.

En el contexto de la presente tesis doctoral, merece la pena ser mencionada la participación del *mio*-inositol en la composición de los glicosilfosfatidil inositoles y los inositolfosfolípidos, dos familias de compuestos muy relacionadas entre sí.

En las células eucarióticas, muchas proteínas se encuentran “ancladas” a la superficie externa de la membrana plasmática mediante unión covalente a glicolípidos que contienen inositol³. Estos glicosil fosfatidil inositoles ó GPI orientan a las proteínas hacia el medio extracelular y permitirían su liberación tras hidrólisis provocada por acción de una fosfolipasa:

PLC o PLD. Las proteínas ancladas a membranas mediante GPIs presentan una gran variedad de funciones: enzimas (fosfatas alcalina, AChE, 5'-nucleotidasa, etc), receptores (CD14, CD16, receptor de uroquinasa, etc), antígenos de mamíferos (Thy-1, CD55, CD52, Ly6, etc), así como los priones PrP^c y PrP^{Sc}, NCAM-120 entre otras.⁴ A pesar de esta diversidad presentan algunas características comunes como una menor velocidad de recambio, mayor movilidad superficial y una accesibilidad superior a enzimas proteolíticas, lipolíticas.

Todos los GPIs presentan una estructura común: D-Man- α -(1 \rightarrow 2)-D-Man- α -(1 \rightarrow 6)-D-Man- α -(1 \rightarrow 4)-D-GlcNH₂- α -(1 \rightarrow 6)-D-*mio*-inositol. El extremo C-terminal de la proteína se une mediante una unidad aminoetanolfosfatil a la posición 6 de la manosa del extremo no reductor y esta unidad se ancla a la membrana mediante un fosfolípido unido al residuo de inositol (figura 2).⁵ La diversidad estructural de los GPIs de anclaje se genera por los patrones de sustitución que presentan la unidad de trimanosa (sustituyentes R₁, R₂, R₃ y R₄), el anillo de inositol (R₅) y por la naturaleza del lípido que se inserta en la membrana plasmática (X).^{3, 4, 6, 7}

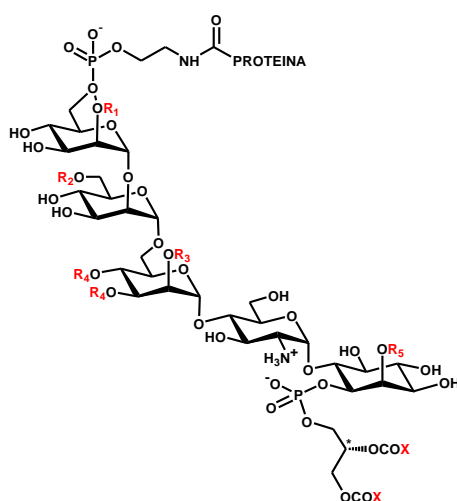


Figura 2. Estructuras típicas de GPIs de anclaje.

Los fosfatidilinositoles solubles en el citoplasma, IP, IP₂, IP₃, actúan como segundos mensajeros intracelulares estableciendo su propio mecanismo de señalización, que está involucrado en la regulación de los niveles de Ca²⁺, a su vez mensajero secundario de otra serie de procesos. Estos compuestos se liberan, previa estimulación de receptores de membrana acoplados a proteínas G, mediante la hidrólisis del enlace fosfodiéster de los correspondientes fosfatidilinositoles PI, PI-(4)P y PI-(4,5)P₂, por acción de las PI-PLCs. El *segundo mensajero* 1,4,5-inositol trifosfato (IP₃) se genera a partir de PI-(4,5)P₂ y al ser liberado en el citoplasma produce la liberación del Ca²⁺ almacenado en el retículo endoplasmático.⁶ Este mecanismo de actuación relaciona a los inositoles fosfato con los GPIs de anclaje puesto que estos también son sensibles a la acción de PI-PLCs, liberando inositolfosfoglicanos y diacilglicerol.⁷

1.2.- MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA.

La insulina es una hormona metabólica de la familia de la citoquinas formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro; es producida por las células de los islotes de Langerhans en el páncreas y constituye un elemento esencial de los mecanismos de regulación de los niveles de glucosa en sangre.

A nivel celular, la insulina produce efectos inmediatos en el metabolismo de la glucosa aumentando su absorción en células musculares y adipocitos y estimulando la síntesis de glucógeno y triacilgliceroles en hepatocitos y adipocitos respectivamente. Además de estos efectos metabólicos la acción de la insulina también se manifiesta en la estimulación de fenómenos de crecimiento como la síntesis de proteínas y de ADN y en efectos mitogénicos.

La elucidación del mecanismo por el cual se transmite y propaga la señal de la insulina para ejercer sus efectos presenta una enorme complejidad debida fundamentalmente al hecho de que la señal diverge en múltiples rutas de transducción. En general, se han propuesto dos mecanismos alternativos que hoy se admite que pueden ser complementarios: la cascada de fosforilación y la hipótesis de los segundos mensajeros.

1.2.1.-LA CASCADA DE FOSFORILACIÓN.

La insulina actúa en la superficie celular uniéndose a su receptor,⁸ una glicoproteína transmembranal compuesta de dos subunidades α y dos β con actividad tirosina quinasa⁹, unidas mediante puentes disulfuro formando un heterotetrámero.¹⁰ Esta interacción da lugar a de *autofosforilación*¹¹ de las subunidades β iniciándose la denominada *cascada de fosforilación*¹² que provoca la rápida fosforilación consecutiva de residuos de tirosina de una serie de proteínas que incluyen los sustratos del receptor de insulina (IRS-1, 2, 3 y 4)¹³ y la proteína Shc¹⁴ (Figura 3).

Estas las proteínas fosforiladas inician, a través una proteína citosólica (Grb-2),¹⁵ la ruta de señalización Grb2-SOS-Ras, que es la responsable de la estimulación de los efectos mitogénicos y de crecimiento celular de la insulina, vía activación de la cascada de la quinasa MAP.¹⁶

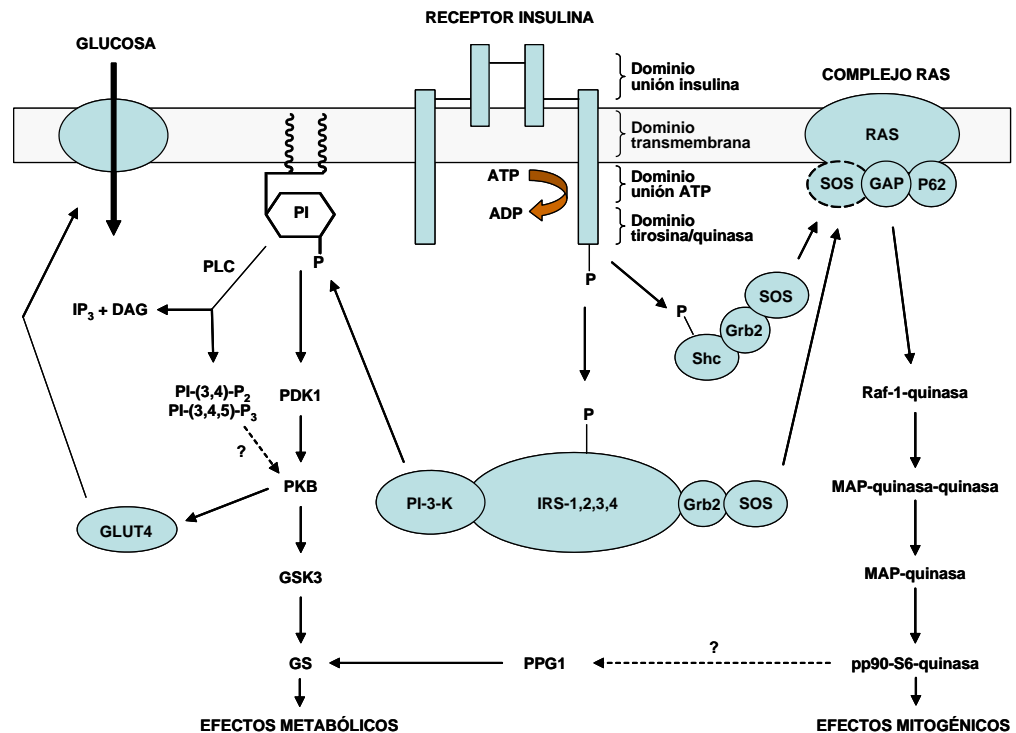


Figura 3. Mecanismo de acción de la insulina.

Paralelamente, se produce la transducción de la señal que produce los efectos metabólicos a través una ruta diferente que está aún menos definida. Las proteínas IRSs interaccionan con la enzima fosfatidilinositol 3 quinasa (PI-3K) que a su vez activa el transporte de glucosa al interior de la célula, por el transportador GLUT4.¹⁷ Para ello, la PI-3K produce la fosforilación de un fosfatidilinositol de membrana que por efecto de una fosfolipasa C (PLC), incrementa los niveles de los fosfatidilinositoles PI-(3)P, PI-(3,4)-P₂ y PI-(3,4,5)-P₃.¹⁸ Estos fosfatidilinositoles activan la proteína quinasa B (PKB) que está aparentemente implicada tanto en la estimulación del transporte de glucosa al interior de la célula, como en la activación de la glucógeno sintasa (GS).¹⁹ Sin embargo, la ruta y mecanismos que rigen la estimulación de la síntesis de glucógeno y la lipogénesis permanecen aún desconocidos.

1.2.2.-LA HIPÓTESIS DEL SEGUNDO MENSAJERO.

El concepto de mediador para la acción de la insulina fue introducido por Larner en 1972,²⁰ que, apoyado en evidencias bioquímicas, propuso que la interacción de la insulina con su receptor daría lugar a la producción intracelular de una molécula capaz de propagar la acción de la misma.

Debido a su escasez, no se ha podido aislar y determinar la estructura exacta de estos mediadores, y sólo ha sido posible proponer unas estructuras parciales que tienen en común el poseer un residuo de inositol. La similitud entre estas estructuras y los GPIs de anclaje han hecho considerar a los GPI de anclaje como posibles precursores (vía la acción de fosfolipasas (GPI-PLC y/o GPI-PLD) de estos mediadores. Esta línea ha sido objeto de numerosos trabajos de investigación recogidos en un gran número de revisiones²¹. La terminología que describe las características químicas de los compuestos relacionados con estos mediadores es: prGPI, proteína unida a glicosilfosfatidil inositol y GPI, glicosilfosfatidil inositol, como lípidos intactos a los cuales está unida la proteína anclada o no respectivamente. IPGpr, proteína unida a inositol fosfoglicano e IPG, inositol fosfoglicano como moléculas solubles en agua derivadas de prGPI y GPI respectivamente.

La *hipótesis de los segundos mensajeros* consiste básicamente en que la insulina, tras interaccionar con su receptor, produce la activación de una fosfolipasa (C o D), la cual hidroliza una molécula de GPI liberando al medio extracelular un IPG (con o sin fosfato respectivamente), que es capaz de introducirse al interior de la célula y, mediante la modulación de enzimas claves, ejercer los efectos de la hormona (Figura 4). La existencia de un mecanismo de este tipo no excluye la existencia simultánea de otros más ampliamente admitidos, a los que se ha hecho referencia en el apartado anterior.

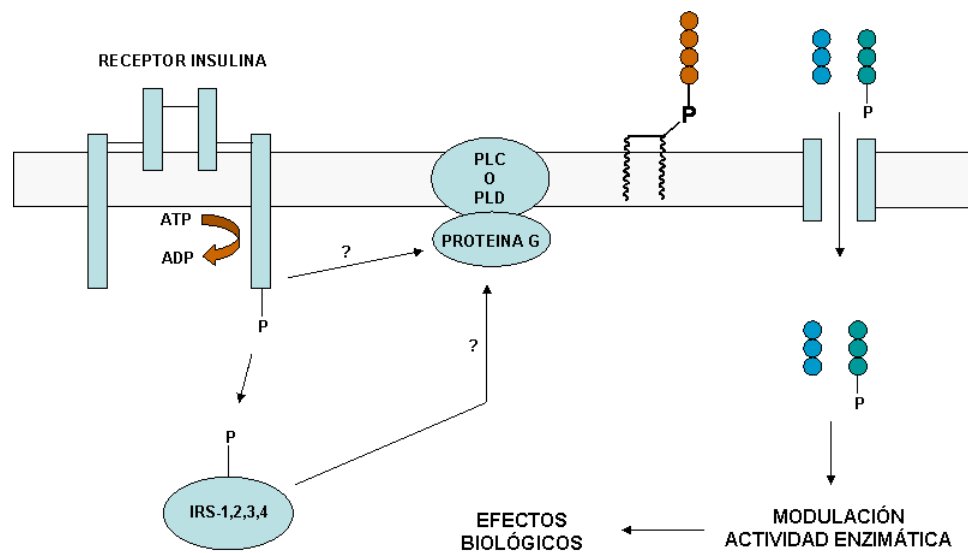


Figura 4. Hipótesis del segundo mensajero para la acción de la insulina.

La hipótesis de los segundos mensajeros, explicaría los efectos de la administración exógena de IPGs. Estos constituirían una familia de compuestos diferentemente glicosidados y fosforilados, de alguna manera análoga a la familia de los inositolfosfatos (IP, IP₂ y IP₃)²². Presenta un atractivo indudable en el potencial tratamiento de aquellas enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina, debido a la posibilidad de acceder a sustancias que mimetizan sus efectos. Sin embargo, el que aun no se conozca la estructura exacta de los IPGs liberados y que no se hayan establecido los mecanismos de su incorporación a la célula son sus principales puntos débiles.

1.2.3.-INOSITOLFOSFOGLICANOS COMO SEGUNDOS MENSAJEROS: IPGs TIPO A y TIPO P.

Las investigaciones realizadas por Larner,²³ Mato²⁴ y Rademacher,²⁵ permiten clasificar los IPGs en dos grupos en función de su estructura básica y sus actividades biológicas. Los IPG de tipo P estarían compuestos por *quiro*-inositol y galactosamina y serían capaces de activar a la PDHP entre otras fosfoproteínofosfatasas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y reguladas por la insulina.^{26,27} Los IPG de tipo A, además de inhibir la PKA, son capaces de estimular la lipogénesis, activar la acetilcoenzima A carboxilasa y modificar las actividades de la adenilato ciclase y fosfodiesterasa de AMP cíclico y estarían constituidos por *mio*-inositol, glucosamina, galactosa y fosfato. Los IPG tipo A y los GPIs de anclaje tienen una alta similitud estructural lo que ha inducido a proponer que estos IPGs provienen de la hidrólisis de GPIs de anclaje mediante la acción secuencial de una proteasa y una fosfolipasa.²⁸ Por el contrario la estructura parcial de los IPGs tipo P, al presentar un anillo de *quiro*-inositol y galactosamina, implicaría a un GPI o prGPI precursor diferente.²⁹

Debido a las dificultades inherentes al aislamiento y determinación estructural de estos segundos mensajeros una estrategia alternativa para profundizar en su caracterización es el estudio de los enzimas clave de esta ruta de transducción, que en este caso serían la PKA y la PDH fosfatasa.

La PKA es la más simple de las proteínas quinasas y la más completamente caracterizada³⁰. El holoenzima inactiva PKA consiste en 2 subunidades reguladoras y 2 catalíticas que se disocian en respuesta de niveles elevados de cAMP intracelular. Una descripción tridimensional de esta subunidad catalítica es obtenida cuando la primera estructura cristalina de una proteína quinasa fue resuelta como un complejo PKA-inhibidor y con Mg²⁺ y ATP.³¹ El conocimiento detallado de las interacciones entre PKA y los inhibidores sintéticos de tipo IPG formarán una de las bases en el diseño de fármacos basados en la estructura de IPGs (véase capítulo 3).

La PDH fosfatasa, por otra parte no ha sido cristalizada. Sin embargo clonando su subunidad catalítica³² ha demostrado un 22% de aminoácidos idénticos con la "*glycogen synthase phosphatase*" (fosfatasa 2C). La estructura cristalina de la fosfatasa 2C ha sido determinada y su centro catalítico es considerado como un modelo estructural para la secuencia relativa a los dominios de la PDH fosfatasa.

El estudio de las interacciones específicas incluyendo la activación de la fosfatasa 2C por moléculas sintéticas de tipo IPGs, podría constituir otra de las bases para el diseño de fármacos de tipo IPG.

Otras enzimas que podrían ser consideradas como dianas u objetivos convenientes en estas relaciones estructura-actividad relacionados con los IPGs, incluyen la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBP) que representa un fármaco diana altamente atractivo para la diabetes de tipo II y cuya estructura ha sido resuelta por rayos X³³.

1.3.- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE CARBOHIDRATOS.

Los carbohidratos participan activamente en funciones biológicas muy diversas: energéticas (glucosa), estructurales (celulosa), inmunológicas y reconocimiento celular (antígenos oligosacáridos), constituyen el esqueleto de los ácidos nucleicos (ribosa) y están implicados en procesos infecciosos. Gran parte de estos fenómenos están fundamentados en procesos de reconocimiento molecular en los que la estructura tridimensional y disposición espacial de grupos funcionales y átomos juega un papel esencial como transmisor de información. En este sentido es necesario destacar que los carbohidratos, por su estructura y composición, proporcionan a la naturaleza una amplia variedad de códigos, muy superior por unidad constitutiva a otros biopolímeros como ácidos nucleicos o proteínas. Continuando esta línea de argumentos se comprende fácilmente la relevancia de los estudios estructurales en carbohidratos.

Aunque existen más métodos de análisis conformacional de carbohidratos, sin duda los más poderosos son la espectroscopia de RMN y la cristalografía de rayos X, ambas en combinación con técnicas de modelado molecular.³⁴ La gran dificultad que presenta la cristalización de estos compuestos ha restringido la aplicación de los métodos de difracción de rayos X, al menos en relación a otras biomoléculas. Por el contrario, el estudio de conformación adoptada en disolución, es abordada a menudo empleando las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN).³⁵

1.3.1.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE CARBOHIDRATOS.

La estructura tridimensional de los carbohidratos se puede describir, además de por las características derivadas de su composición como la configuración de los centros quirales propia de cada residuo, por ciertos parámetros conformacionales específicos.

Para la descripción de los monómeros que constituyen los oligosacáridos es necesario determinar la conformación del ciclo de 6 miembros que origina (formas de piranosa). En la mayoría de los casos las piranosas presentan un comportamiento monoconformacional observando una de las dos posibles formas de silla (habitualmente la 1C_4), aunque es posible encontrar excepcionalmente otras formas. También es posible encontrar anillos de 5 miembros como la ribosa a pesar de que no sean termodinámicamente estables.

La descripción de la estructura de los monosacáridos se completaría con la definición la orientación de los grupos exocíclicos. Estos, mayoritariamente grupos hidroxilos secundarios, se presentan en disposiciones alternadas siendo más estables aquellas que generen redes de enlaces de hidrogeno cíclicos, lo que corresponde a situaciones *clockwise* (c) y *anticlockwise* (r).

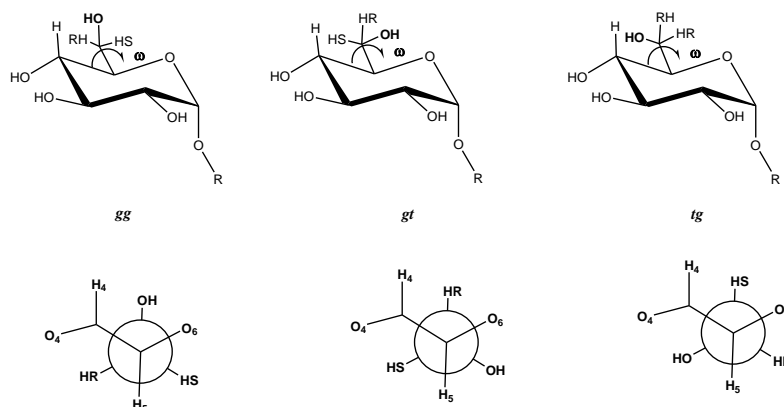


Figura 5. Definición de las tres conformaciones alternadas para el grupo hidroximetilo en D-hexapiranosas.

Un caso especial es la conformación del grupo hidroximetilo en hexapiranosas definida por los rotámeros del enlace C5-C6 (denominado ω : O5-C5-C6-O6). El grupo hidroxilo se puede disponer en 3 orientaciones alternadas, denominadas *gauche-gauche* (gg), *gauche-trans* (gt) y *trans-gauche* (tg) (figura 5). La distribución de las poblaciones de estos rotámeros depende de una compleja combinación de efectos, siendo el factor determinante la orientación relativa del sustituyente en la posición 4. Una amplia recopilación de datos experimentales indica, que para azúcares de la serie D, las poblaciones relativas de los rotámeros gg:gt:tg para configuraciones tipo gluco y galacto se encuentran en torno a 60:40:0 y

20:60:20, respectivamente. Sin embargo, estos equilibrios se ven modificados por efectos de solvatación.

No obstante el factor más influyente en la conformación de carbohidratos es la geometría del enlace glicosídico, ya que esta define la orientación relativa de dos unidades monosacáridicas consecutivas. Esta geometría viene definida por la rotación de dos enlaces: el glicosídico C1-O1, caracterizada por la torsión Φ (H1'-C1'-O1'-Cx) y el aglicónico O1-Cx, definida por la torsión Ψ (C1'-O1'-Cx-Hx). La estructura tridimensional de estos compuestos depende fundamentalmente de la rotación alrededor de estos enlaces, denominados enlaces de torsión glicosídicos.

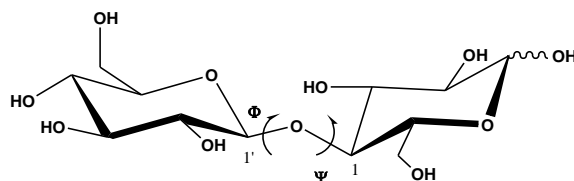


Figura 6. Representación de la estructura de un disacárido.

Las fuerzas que intervienen en la estabilización de las conformaciones de los carbohidratos en disolución, al igual que para otras moléculas, son: los enlaces de hidrógeno, las interacciones estéricas, las fuerzas de van der Waals y electrostáticas junto con otros factores, como la solvatación.³⁶ Sin embargo, existen dos importantes efectos peculiares de los carbohidratos y que se deben tener en cuenta en los carbohidratos y que son los denominados efectos anomérico y *exo*-anomérico.³⁷ El efecto anomérico, propuesto por Lemieux³⁸, se refiere a la preferencia que muestra cualquier sustituyente electronegativo en el carbono 1 de un anillo de piranosa por una configuración axial, en contra de lo que cabría esperar considerando criterios exclusivamente estéricos. De la misma naturaleza, el efecto *exo*-anomérico se manifiesta como una preferencia del enlace exocíclico O1-R por adoptar una orientación *gauche* respecto al enlace C1-O5 (figura 7).

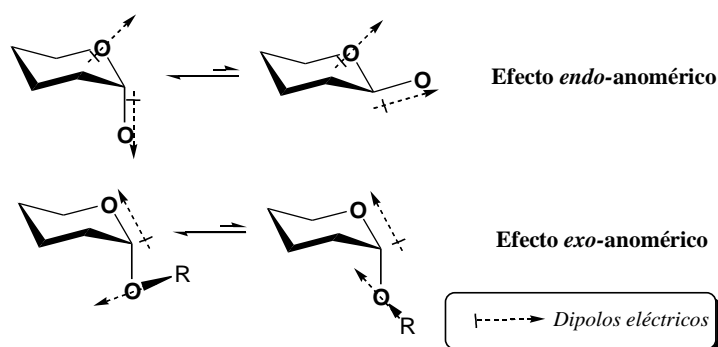


Figura 7. Representación de los efectos endo- y exo-anomérico.

Para justificar estos efectos se han propuesto dos explicaciones alternativas. Una de ellas considera a las interacciones electrostáticas entre los dipolos asociados a los enlaces C-O, principales responsables de estos efectos: predominancia del isómero axial frente al ecuatorial (efecto anomérico) y del conformero *gauche* (efecto exoanomérico). Otra explicación, basada en la teoría de orbitales moleculares fronteras, atribuye la estabilización anomérica a un fenómeno de *hiperconjugación* $n \rightarrow \sigma^*$, sólo posible en disposiciones *anti-periplanar* entre el par solitario sobre el oxígeno y el orbital tipo σ (figura 8). Esta interacción supone la transferencia electrónica parcial entre el orbital n que aloja el par solitario de electrones sobre el átomo de oxígeno y el orbital antienlazante σ^* del enlace C-O adyacente, como consecuencia del solapamiento favorable entre dichos orbitales (figura 8).

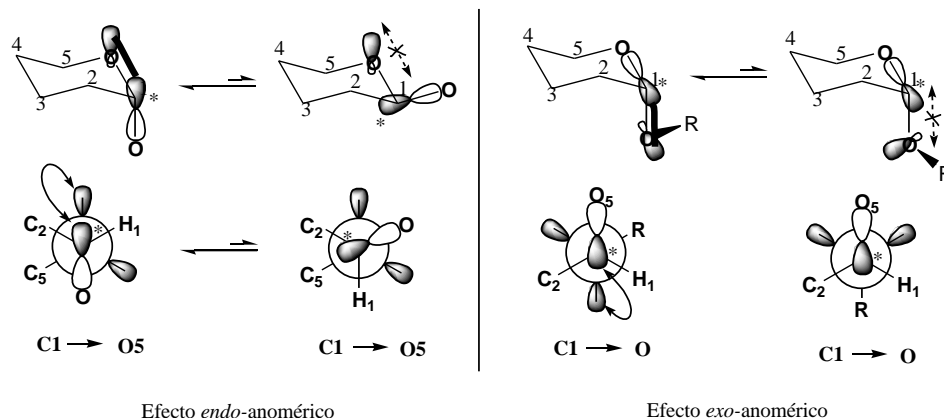


Figura 8. Representación esquemática del origen electrónico de los efectos *endo*- y *exo*-anomérico.

Durante años la controversia entre ambas explicaciones no ha podido ser claramente resuelta. Sin embargo, estudios recientes³⁹ han demostrado que este tipo de interacciones orbitálicas son más frecuentes y generales de lo que se pensaba. Así, se ha podido demostrar que la mayor estabilidad de las conformaciones *alternadas* del etano, respecto de las *eclipsadas*, no resulta, como tradicionalmente ha sido aceptado, de las repulsiones estéricas por el solapamiento de los orbitales de enlace C-H que tiene lugar en éstas últimas, sino que es una consecuencia de las interacciones hiperconjugativas que se originan, en el caso de las conformaciones *alternadas*, entre los orbitales ocupados de baja energía σ_{C-H} y los orbitales vacíos, de mayor energía, σ_{C-H}^* ^{39,40}

1.3.2.- RMN DE CARBOHIDRATOS.

A pesar de su relativa sencillez, los espectros de RMN de los oligosacáridos presentan una elevada complejidad debida a la poca dispersión que presentan los protones de los anillos.

Así, la mayor parte de las señales aparecen en un rango que oscila entre 4,5 y 3,5 ppm dando lugar a frecuentes solapamientos y situaciones de acoplamiento fuerte. Afortunadamente las señales de los protones anoméricos aparecen en el rango de 4,4-5,5 ppm constituyendo un buen punto de partida para el análisis estructural ya que, además, sus valores de desplazamiento químico tanto de ^1H como de ^{13}C y de acoplamiento escalar permiten determinar la configuración anomérica con relativa facilidad.^{41,42,43} Para aquellas señales localizadas fuera de la región de mayor solapamiento, Vliegthart *et al.*⁴⁴ introdujeron la denominación de “grupo-informador-estructural” (*structural-reporter-group*), o “huella dactilar”, ya que los desplazamientos químicos de dichas señales dependen fuertemente de la estructura del carbohidrato. Mediante esta aproximación es posible identificar azúcares individuales, de residuos, motivos estructurales o azúcares específicos y composiciones de enlaces glicosídicos por comparación con bases de datos adecuadas.^{45,46, 47}

Los métodos de asignación se basan frecuentemente en la determinación de sistema de spin de cada residuo mediante la combinación de experimentos de acoplamiento escalar homonucleares como DQF-COSY y TOCSY. En este punto ya se habrá obtenido información, al menos parcial de la configuración de los residuos. Para completar la asignación es necesario establecer la conectividad entre determinados sistemas de espines. Para esta fase generalmente se emplean experimentos NOESY capaces de establecer conectividades a través del espacio entre los distintos residuos. Sin embargo en el contexto del análisis de oligosacáridos, se han propuesto otros métodos basados en acoplamientos escalares a largo alcance ^1H - ^{13}C o en el efecto de la glicosilación sobre el desplazamiento químico del carbono más próximo.

Los desplazamientos químicos de ^{13}C se obtienen fácilmente mediante los experimentos HSQC ó HMQC, que además se benefician de una mayor dispersión espectral que simplifica su análisis. Esta mejora de la dispersión se puede emplear en combinación con transferencias homonucleares para solventar las dificultades asociadas solapamientos graves. Así, en combinación con transferencias TOCSY los experimentos 2D HSQC-TOCSY⁴⁸, HMQC-TOCSY,⁴⁹ han sido ampliamente utilizados. Similarmente, los espectros 2D HMQC-NOESY⁵⁰ y HSQC-NOESY proporcionan conectividades entre la unión glicosídica y pueden ser útiles en casos con solapamiento severos.

Debido a sus características espectrales: tiempos de relajación relativamente largos y un número moderado de señales algunas de las cuales aparecen típicamente fuera de la zona de solapamiento los análogos monodimensionales de los experimentos bidimensionales son especialmente útiles en carbohidratos.⁵¹ En este sentido es conveniente destacar las ventajas de la implementación de esquemas de selectivos mediante gradientes de campo magnético como

dpfgse (Double Pulse Field Gradient Spin Echo)⁵² que proporciona una >gran sensibilidad y limpieza en los espectros sin implicar un excesivo aumento de la complejidad experimental.

Elucidación estructural por RMN:

Al menos, son tres los parámetros espectrales que contienen información estructural y son utilizados en el análisis conformacional de oligosacáridos⁵³: el desplazamiento químico, que aunque es muy sensible a la estructura del entorno resulta difícil de interpretar cuantitativamente;⁵⁴ las constantes de acoplamiento vecinales, que se relacionan con ángulos de torsión, mediante ecuaciones de tipo Karplus;⁵⁵ y el Efecto Nuclear Overhauser⁵⁶ que permite extraer distancias interprotónicas experimentales. Recientemente, se ha explorado con éxito la aplicación de constantes dipolares residuales en medios parcialmente orientados en estudios estructurales de oligosacáridos.⁵⁷

Constantes de acoplamiento escalares:

Las constantes de acoplamiento homonucleares caracterizan la disposición relativa axial ó ecuatorial de los sustituyentes en un residuo de piranosa o furanosa de manera que es posible determinar su configuración y conformación. Desde una óptica estructural, conocida la configuración del monosacárido, los valores de $^3J_{H-H}$, deben permitir determinar la conformación o conformaciones preferentes del anillo de cinco o seis miembros del residuo. Otro elemento estructural para el que son clave estos acoplamientos es la evaluación de la disposición del grupo hidroximetilo entre las posibles conformaciones alternadas (*gg/gt/tg*) mediante las constantes $^3J_{H5-H6proR}$ y $^3J_{H5-H6proS}$. Por último, las constantes de acoplamiento $^1H-^{13}C$ pueden utilizarse para determinar los ángulos de torsión glicosídicos, en particular entre el protón anomérico y el carbono aglicónico. Sin embargo, la dificultad que implica su obtención, prácticamente limitada a muestras isotópicamente marcadas, restringe su utilización.

Efecto Nuclear Overhauser (NOE):

El Efecto Overhauser Nuclear (NOE) es el cambio en la intensidad neta de una señal de un determinado núcleo como consecuencia de una perturbación de la resonancia de otro núcleo que se encuentra próximo en el espacio a éste primero. Su origen está en la redistribución de poblaciones producida como consecuencia de la relajación cruzada dipolo-dipolo entre estos dos núcleos.⁵⁸ La importancia del NOE en análisis estructural y conformacional reside en su dependencia de la distancia entre los átomos, y por lo tanto, en la información sobre la estructura tridimensional de las biomoléculas que los contienen.

Al tratarse de un fenómeno de relajación tiene una compleja dependencia del movimiento molecular lo que dificulta la extracción directa de distancias interprotónicas. Para emplear la información implícita en el NOE en la determinación de estructuras tridimensionales, se pueden emplear varias aproximaciones. La más sencilla es el *análisis*

cualitativo, para el que se asume que la observación de NOE implica una distancia menor de una dada (3-3,5 Å en oligosacáridos), en el que por confrontación del patrón de NOEs observado con posibles estructuras candidatas permite evaluar la bondad del modelo empleado para el pronóstico de esas estructuras. La otra posibilidad consiste en realizar un *análisis cuantitativo* de las constantes de velocidad de relajación cruzada longitudinal σ_{ij}^{NOE} , con el fin de derivar las distancias internucleares correspondientes.⁵⁹

Debido a la propia naturaleza de los oligosacáridos, con escasos NOEs estructuralmente relevantes, considerable flexibilidad y tamaño moderado, la información experimental suele ser insuficiente como para definir por sí misma la estructura. Por ello se recurre habitualmente a la obtención de distancias experimentales muy precisas y a combinar el análisis con cálculos teóricos.

Acoplamiento dipolar residual.

La necesidad de mejorar la precisión de las estructuras calculadas por RMN en disolución ha estimulado la búsqueda de nuevas restricciones geométricas, especialmente a largo alcance. Entre estas es necesario destacar a las constantes de acoplamiento dipolares residuales (RDC) que se observan cuando las moléculas están parcialmente ordenadas respecto al campo magnético de forma que la magnitud de este acoplamiento refleja la orientación de los núcleos acoplados respecto del campo. Aunque originalmente el método se desarrolló para proteínas ha sido también aplicado también a carbohidratos: Prestegard et al.⁶⁰ Tjandra & Bax⁶¹

Determinación Experimental de Distancias interprotónicas a partir del NOE

Las intensidades de un espectro 2D NOESY para un tiempo de mezcla t_m (periodo de evolución del NOE) están representadas por la matriz $V(t_m)$ según:

$$V(t_m) = \exp(-R \cdot t_m) \cdot V(0)$$

donde R es la matriz de relajación constituida por los elementos:

$$\rho_{ii} = Q \cdot \sum_{i,j} (J_{0,ij}(\omega) + 3J_{1,ij}(\omega) + 6J_{2,ij}(\omega)) + \rho_{1,i}$$

$$\sigma_{ij} = Q \cdot [6J_{2,ij}(\omega) - J_{0,ij}(\omega)]$$

donde: $Q = 0.1\gamma^4\hbar^2$

En principio, los elementos de fuera de la diagonal se pueden relacionar con la distancia interprotónica, siendo el volumen de los picos de cruce función de las relaciones espaciales mutuas entre todos los protones de la molécula. Sin embargo, tanto la constante de velocidad de relajación cruzada, σ_{ij} (elementos de fuera de la diagonal), como la de autorrelajación, ρ_{ii} (elementos de la diagonal) dependen de las densidades espectrales. La función de densidad espectral, $J_n(\omega)$, que formalmente es la transformada de Fourier de la función de correlación del vector internuclear r_{ij} considerado, refleja la capacidad de los movimientos moleculares para producir relajación en función de su tiempo de correlación y amplitud.

Es decir, la relación entre los volúmenes de los picos de cruce depende de la disposición relativa de los protones de la molécula, pero, además, del movimiento absoluto de cada par de protones. Esta última dependencia complica el análisis, puesto que es, en principio, independiente para cada par de núcleos considerado. Para resolver este conflicto, la primera aproximación que se asume es considerar que la molécula presenta un comportamiento de sólido rígido (todos los vectores r_{ij} se mueven igual y pueden ser descritos por la misma función $J(\omega)$). Asumido este punto, es necesario considerar que cada pareja de núcleos no se encuentra aislada, sino que forma parte de una red de sistemas que relajan conjunta y simultáneamente.

La *aproximación de los pares de espines aislados* (ISPA) asume que para tiempos de mezcla suficientemente cortos la intensidad de los picos de cruce sólo depende de la velocidad de relajación cruzada (el término fuera de la diagonal correspondiente). Esta aproximación sólo es válida para tiempos de mezcla cortos respecto a T_1 . Bajo esta aproximación se calcula σ_{ij} a partir de los volúmenes de los picos de cruce a varios tiempos de mezcla y ésta se relaciona con una distancia conocida mediante la fórmula:

$$r_{ij} = r_{ref} \left(\frac{\sigma_{ref}}{\sigma_{ij}} \right)^{1/6}$$

Alternativamente, los efectos de la relajación en sistemas de múltiples espines se pueden tratar rigurosamente si se analiza completamente la matriz de intensidades, V . A partir de ella se calcula la matriz de relajación, cuyos elementos fuera de la diagonal contienen la información de las distancias interprotónicas deseadas. Prácticamente es imposible medir experimentalmente todos los volúmenes necesarios para realizar este cálculo por lo que es

necesario recurrir a métodos iterativos conocidos como aproximación de la matriz de relajación completa⁴¹.

1.3.3.- MODELADO MOLECULAR DE CARBOHIDRATOS: MÉTODOS DE CAMPOS DE FUERZAS.

El objetivo de la elucidación estructural para biomoléculas flexibles (como los oligosacáridos) por medio de cálculos teóricos, debe ser la obtención de una estructura o un conjunto de éstas que justifiquen los datos experimentales. El marco teórico ideal para el estudio de las biomoléculas, como para cualquier sistema físico-químico, es la mecánica cuántica. Desafortunadamente su principal inconveniente es el enorme coste computacional lo que hace que la mayoría de sistemas moleculares de interés bioquímico, que implican la consideración de hasta varios cientos de átomos, sean prácticamente inabordables mediante dicha metodología.

Los métodos de “campos de fuerzas” tienen la ventaja de reducir considerablemente dicho coste computacional a costa de asumir una serie de aproximaciones. La primera, y más importante, es la *aproximación de Born-Oppenheimer* (las descripciones de los movimientos nucleares y electrónicos son independientes y separables). Fundamentada en esta hipótesis, la mecánica molecular, se centra en el estudio de los movimientos nucleares, asumiendo que las propiedades moleculares de interés (energía,..., etc.) se pueden derivar del conocimiento de las 3N coordenadas cartesianas espaciales de los núcleos que constituyen el sistema. Una limitación importante de estos métodos es que generalmente no son válidos para propiedades moleculares que requieran un conocimiento de las distribuciones electrónicas (reacciones de roturas y formaciones de enlace; Diels-Alder,..., etc

Potencial de campo de fuerzas.

En los cálculos denominados de mecánica molecular (MM), la función matemática que expresa la energía de la molécula en función de las 3N coordenadas espaciales atómicas (x_i, y_i, z_i), recibe el nombre de *campo de fuerzas*. Es importante resaltar que la MM es una metodología totalmente empírica, en el sentido de que se requiere la inclusión de parámetros determinados experimentalmente. Esto implica que los métodos de campos de fuerzas no generan “valores absolutos” de energía y aunque sea una técnica útil para el cálculo de energías relativas entre conformeros es necesario interpretar cuidadosamente los resultados energéticos.

La expresión matemática general para un campo de fuerzas es:

$$E_{Pot} = \sum_{enlaces} V_{enl} + \sum_{ángulos} V_{ang} + \sum_{diedros} V_{died} + \sum_{NB} V_{NB} + \sum_{elec} V_{elec} \dots$$

Dentro de la expresión general del campo de fuerzas, se incluyen términos de energía de deformación de enlace, energía de deformación de ángulo de valencia, energía de torsión, o deformación de ángulos diedros, energía de interacción de no-enlace (tipo van der Waals) y energía de interacción electrostática. Cada uno de estos términos tiene un desarrollo matemático determinado, que puede diferir entre distintos campos de fuerzas.

Peculiaridades estructurales propias de los carbohidratos como los efectos anomérico y exo-anomérico o la compleja dependencia del disolvente de los rotámeros de los grupos hidroximetilo han sido aspectos difíciles de simular por los campos de fuerzas menos sofisticados. Una solución empleada frecuentemente ha sido incluir modificaciones de estos campos de fuerzas para incluir efectos característicos de los carbohidratos. Tradicionalmente, los campos de fuerzas que se han utilizado en el análisis conformacional de oligosacáridos, y que, por lo tanto incluyen un término en el potencial para el efecto *exo*-anomérico, se han dividido en dos grupos que implican dos filosofías distintas. El primer grupo asume que la conformación del oligosacárido está determinada exclusivamente por las interacciones de van der Waals. Esta aproximación se ha denominado “*modelo de esferas duras*”. El campo de fuerzas correspondiente se denomina HSEA (*Hard Sphere Exo-Anomeric*).⁶² En el segundo grupo la energía potencial se expresa como la suma de las contribuciones energéticas de las deformaciones de distancia de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros, así como de las interacciones de no-enlace. Dentro de esta categoría se incluirían los campos de fuerzas conocidos como “*macromoleculares*” y, para muchos de los que se han descrito extensiones de parámetros para carbohidratos.

Simulación del disolvente

La aproximación más evidente para la simulación del efecto del disolvente en simulaciones teóricas es su inclusión explícita en el sistema a estudiar. Esta aproximación implica usar métodos adicionales para evitar efectos de borde en sistemas finitos, como por ejemplo las condiciones de contorno periódicas. El gran número de moléculas de disolvente que es necesario incluir para “solvatar” adecuadamente el soluto implica un considerable aumento del sistema a estudiar con el consiguiente coste computacional. Por ello, es frecuente recurrir a otras alternativas para simular el efecto del disolvente en el sistema, que son los denominados “modelos continuos de disolvente”. En orden de complejidad, el primer modelo considera al disolvente como un medio continuo dieléctrico y polarizable, caracterizado por una constante dieléctrica ϵ . Esta es la manera más simple de representación del efecto del disolvente en las interacciones electrostáticas y a su favor cuenta el bajo coste computacional que supone. Aunque se emplean valores de constante dieléctrica comprendidos entre 1 y 80, algunos autores⁶³ muestran que los mejores resultados se obtienen cuando se emplean ϵ comprendidos entre 20 y 80, donde las interacciones de Coulomb se encuentran tan amortiguadas que las interacciones a largo rango prácticamente no existen.

Otro modelo continuo más complejo, incluye términos que describen las energías de solvatación no polar y las energías electrostáticas continuas, es el modelo GB/SA (*Generalised Born/Surface Area*)⁶⁴. Puesto que este ha sido el modelo más utilizado a lo largo de la presente tesis doctoral se hace necesaria una explicación más detallada de sus fundamentos.

El soluto se incluye en una cavidad creada *ad hoc* y la interacción de éste con el medio dieléctrico se considera como una interacción electrostática (la distribución de cargas del soluto polariza el medio). Para la evaluación de la variación de la energía libre de Helmholtz que supone el proceso de solvatación (ΔA_{sol}) se considera el siguiente proceso:

Se parte de una molécula aislada de soluto (o conjunto molecular) más un continuo dieléctrico.

Se crea una “cavidad” dentro del dieléctrico que será la que aloje al soluto. Este proceso supone una variación positiva de la energía libre, que se denomina energía de cavitación, ΔA_{cav} . Existen diferentes aproximaciones para su cálculo, como la de asociar dicha energía con el trabajo necesario para crear una superficie en el líquido, que dependerá de la tensión superficial de éste.

Se estima la variación de energía libre de la introducción del soluto en la cavidad como dos contribuciones.

3.1) La variación de energía libre debida a las interacciones soluto-disolvente de carácter dispersivo, ΔA_{disp} , debido al acoplamiento de las polarizaciones instantáneas de las moléculas que interaccionan. Esta contribución es siempre negativa.

3.2) La variación de energía libre debida a la carga de carga del soluto dentro de la cavidad en presencia del continuo dieléctrico polarizable, ΔA_{elec} . Se suele denominar "*contribución electrostática*". El origen de este término está en la interacción electrostática del soluto con el potencial electrostático que el medio continuo genera en la cavidad como consecuencia de su polarización, provocada, a su vez, por las cargas del soluto.

De esta forma, ΔA_{sol} , viene dada por:

$$\Delta A_{sol} = \Delta A_{elec} + \Delta A_{disp} + \Delta A_{cav}$$

Métodos computacionales en el análisis conformacional de carbohidratos.

Una vez determinado el campo de fuerzas adecuado para nuestro sistema, es posible evaluar la energía potencial molecular para una conformación determinada. En general, la forma en la que varía la energía viene dada por una complicada función multidimensional de las coordenadas atómicas, que es denominada *superficie de energía potencial* (o *hipersuperficie*). Lógicamente, los estados estables del sistema se pueden localizar sobre dicha superficie analizando sus mínimos. Debido a la complejidad de esta función es necesario recurrir a métodos iterativos para la determinación de los puntos mínimos. Estos algoritmos ("descenso pronunciado", "gradientes conjugados",...) permiten ir disminuyendo progresivamente el contenido energético de una determinada estructura variando sistemáticamente las coordenadas atómicas hasta alcanzar un mínimo relativo. No obstante, para moléculas con un número elevado de grados de libertad, es frecuente la existencia de múltiples mínimos. En estos casos, el mínimo energético que se alcance dependerá, lógicamente, de la estructura de partida elegida, ya que, normalmente, el algoritmo de minimización sólo puede avanzar en la dirección de energía decreciente. Por ello es necesario recurrir a procedimientos más complejos con el fin de examinar exhaustivamente el espacio conformacional completo.

Búsqueda conformacional sistemática

La aplicación de los métodos *sistemáticos* de búsqueda conformacional para carbohidratos se basa en asumir que la estructura tridimensional (conformación global) de un oligosacárido viene principalmente determinada por las orientaciones de los enlaces glicosídicos individuales, lo cual es cierto para la mayoría de oligosacáridos, cuyos anillos

constituyentes suelen ser relativamente rígidos bajo condiciones no reactivas, siendo los grupos exocíclicos los principales puntos de flexibilidad.

Bajo estas suposiciones la geometría global de los conformeros de baja energía va a depender principalmente de las rotaciones en torno a los enlaces glicosídicos (Φ, Ψ). Esto quiere decir que el espacio conformacional accesible a un determinado disacárido puede ser explorado eficientemente mediante la variación sistemática de dichas torsiones en pequeños incrementos $\Delta\alpha$ sobre el intervalo total de 360° . Una vez generado de esta forma el conjunto de conformeros que representan todo el espacio conformacional (Φ, Ψ), se pueden elaborar tres tipos de superficies energéticas: mapas “rígidos”, mapas “relajados”, y mapas “adiabáticos”, de energía potencial.

Los mapas *rígidos* de energía potencial se obtienen simplemente calculando la energía de cada uno de los conformeros de dicho colectivo (Φ, Ψ), mediante la expresión del campo de fuerzas adecuado. Esta es la esencia del campo de fuerzas de esferas duras (HSEA), ya que los residuos son tratados como rígidos, y los grupos exocíclicos se mantienen fijos. Uno de los defectos principales de esta aproximación es la aparición de interacciones estéricas importantes entre distintos grupos exocíclicos para determinados valores de (Φ, Ψ) que no pueden ser relajadas y que, por tanto, suponen un súbito incremento de la energía. Hoy día, dicha aproximación sólo se justifica para la obtención de geometrías iniciales libres de impedimentos estéricos importantes, destinada a estudios posteriores de mayor precisión.

En los mapas *relajados* de energía potencial, las tensiones estéricas presentes en los mapas rígidos son eliminadas incluyendo una segunda etapa de optimización geométrica parcial en la que se permite la relajación energética de todos los grados de libertad, excepto las torsiones directoras (Φ, Ψ). Durante el proceso de minimización energética, los grupos exocíclicos se moverán hacia el mínimo más próximo. De esta forma, los mapas relajados describen más precisamente la superficie de energía potencial accesible, disminuyen las barreras entre mínimos relativos, y localizan mínimos de energía mucho más baja que la/s estructura/s de partida.

A pesar de la mayor eficacia en la localización de las regiones de mínima energía de los mapas relajados, éstos no consideran el problema de “múltiples mínimos”. Para un punto dado (Φ, Ψ) del espacio conformacional descrito por el mapa relajado es posible que aun puedan producirse conformaciones de menor energía por rotación de los grupos exocíclicos. Para solventar este inconveniente se emplean los mapas *adiabáticos*. En este tipo de mapas se realiza una exploración exhaustiva de las posibles combinaciones de orientaciones de todos los grupos exocíclicos presentes. Estrictamente, si asumimos que cada grupo exocíclico presente

puede encontrarse tres posibles conformaciones alternadas, sería necesario generar 3^N conformaciones diferentes para cada punto del espacio (Φ, Ψ) , siendo N el número de grupos exocíclicos. Esta estrategia exhaustiva resultará en un tiempo computacional excesivo, siendo aconsejable reducir éste considerando únicamente las orientaciones a priori más estables como las *gg*, *gt*, *tg* del grupo hidroximetilo o las disposiciones *clockwise* o *anticlockwise* que maximizan el número de enlaces de hidrógeno.

Búsqueda conformacional no sistemáticos: métodos MonteCarlo.

Entre los métodos no sistemáticos, el más ampliamente utilizado es el método de Metrópolis Monte Carlo (MMC).⁶⁵ Esencialmente consiste en generar configuraciones del sistema de forma aleatoria, mediante la variación de aquellos grados de libertad que se consideren más relevantes para la molécula objeto de estudio, y posteriormente aplicar criterios energéticos para aceptar o rechazar una determinada configuración nueva. Si este procedimiento es aplicado durante un número estadísticamente significativo de etapas, se genera un colectivo en el que cada conformación se repetirá según su factor de probabilidad de Boltzmann. Simulaciones de tipo MMC permiten la obtención de propiedades moleculares promediadas en colectivo (espacio configuracional), pero, si queremos obtener propiedades dinámicas del sistema (espacio de fases) deberemos recurrir a otras técnicas de simulación estadísticas, tales como la dinámica molecular.

Dinámica Molecular Newtoniana (DM):

Este es un método determinista, que consiste, básicamente, en calcular la evolución en intervalos de tiempo Δt de las posiciones y momentos de todas las partículas del sistema considerado, conociendo tanto los valores iniciales de ellos como la totalidad de las fuerzas del sistema de partículas. Para ello se aplican las leyes de la dinámica de Newton empleando las fuerzas que se determinan a partir de las funciones matemáticas que definen el campo de fuerzas.

$$\frac{dv_i}{dt} = F_i / m_i \quad - \frac{dV}{dr_i} = F_i$$

El resultado final es un conjunto de puntos que describen una trayectoria determinada sobre el espacio de fase. Los tiempos de simulación empleados están en el orden de decenas de picosegundos (ps) a varios nanosegundos (ns), dependiendo del tamaño del sistema estudiado. Existen diferentes algoritmos para llevar a cabo el proceso de integración de las ecuaciones newtonianas en incrementos finitos de tiempo Δt , siendo los más utilizados el de *Verlet*⁶⁶ y el de *“leapfrog”*. Estos métodos, además, suelen incorporar algoritmos para acoplamientos a

“baños térmicos” o “pistones” para llevar a cabo simulaciones a temperatura (NTV) o a presión (NTP) constante, respectivamente.

En dinámica molecular, a partir de las trayectorias obtenidas, se pueden calcular los promedios termodinámicos de cualquier propiedad molecular, A , como promedios temporales (hipótesis ergódica):

$$\langle A \rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M A(p_i^N, r_i^N)$$

Dinámicas Moleculares de Langevin ó Estocásticas:

En contraste con las dinámicas moleculares Newtonianas (DM), están basadas en las ecuaciones de Langevin del movimiento, caracterizándose porque incorporan explícitamente el control de temperatura y los efectos amortiguantes del disolvente en la simulación. Esta aproximación genera conjuntos rigurosamente canónicos (NVT). Los efectos amortiguantes se consideran imponiendo una fuerza friccional al el movimiento del soluto a través del disolvente. ($F_{\text{friccional}}$). La temperatura del sistema es controlada incluyendo colisiones aleatorias con el disolvente, $R(t)$, en la ecuación básica. Así, la ecuación del movimiento para una partícula i puede ser escrita ahora como:

$$m_i \frac{d^2 x_i(t)}{dt^2} = F_i \{x_i(t)\} - \xi \frac{dx_i(t)}{dt} + R_i(t) \quad \text{Ecuación de Langevin}$$

En muchas simulaciones de sistemas soluto-disolvente, sobre todo en las regiones lejanas de la molécula de soluto. Entre las técnicas que incorporan los efectos del disolvente sin requerimiento de moléculas de disolvente explícitas, se encuentran las de “*potencial de campo promedio*” (PMF) y los modelos de “*dinámicas estocásticas*” (SD).

Una de las principales ventajas de los métodos estocásticos es el ahorro de tiempo computacional, frente a simulaciones con disolvente explícito. Por ello son útiles en aquellos sistemas en los que el principal aspecto de atención es el comportamiento del soluto mientras que el disolvente es de poco interés. Este ahorro posibilita realizar simulaciones mucho más largas. Por ejemplo, Widmalm y Pastor⁶⁷ llevaron a cabo dinámicas moleculares y estocásticas de 1 ns, de una molécula de etilenglicol en disolución acuosa con el soluto y 259 moléculas de agua. Las simulaciones de dinámica molecular tardaron 300 horas mientras que las dinámicas estocásticas sólo llevaron 24 minutos. La reducción en la duración de las simulaciones de SD

no solamente se debe al menor número de moléculas presentes sino también al hecho de que pueden ser usados tiempos de integración mayores.

1.4.- OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL.

El punto débil de la hipótesis del segundo mensajero es el que a pesar de los esfuerzos realizados aun no se han aislado y caracterizado adecuadamente desde el punto de vista químico estos segundos mensajeros o IPGs. Nuestro laboratorio, dentro de una aproximación encuadrada dentro de la química biológica, pretende contribuir a la elucidación de estas estructuras. Para ello, la investigación básica realizada, ha estado orientada a establecer una química que funcione eficazmente para preparar posteriormente librerías de compuestos de las que pudieran resultar moléculas activas. Concretamente, los resultados de los trabajos relacionados con el diseño, la síntesis y la actividad biológica de IPGs de tipo A, P y GPIs han sido recogidos en las Tesis doctorales de María Flores, Javier López Prados, Julia Bonilla Carmona, Francisco Alfonso Pérez y Niels Reichardt. Paralelamente, se han efectuado estudios estructurales de los compuestos sintetizados con el fin de contribuir, conjuntamente con las medidas de actividad biológica, a definir y delimitar los requerimientos estructurales de los IPGs. Los resultados de los estudios estructurales se recogen en esta Tesis, y parcialmente en las de Juan Félix Espinosa y Franck Chevalier.

El principal objetivo de la presente tesis doctoral, ha sido la realización de un estudio estructural de una serie de compuestos sintéticos, potenciales (figura 9), mediadores de IPGs de tipo A y P, a través de espectroscopia de RMN y de cálculos teóricos de campo de fuerzas.

El trabajo realizado se presenta en esta Memoria como se indica a continuación:

En el capítulo 2 se presentan los estudios de pseudodisacáridos que contienen como ciclitol: *quiro*-inositol, *mio*-inositol y de O-metil-*quiro*-inositol. Estos productos fueron diseñados a partir de la información fragmentada de la estructura de los compuestos naturales combinada con los posibles mecanismos propuestos para su generación de acuerdo con esta hipótesis.

A partir de los resultados obtenidos sobre los compuestos anteriores y basadas en unos estudios de docking sobre el sitio de unión del ATP en la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMP cíclico, realizados en nuestro laboratorio por el Dr. Félix Cuevas, se establecieron unas nuevas premisas para el diseño racional de potenciales IPGs. Los estudios realizados sobre los compuestos sintetizados bajo este nuevo modelo se presentan en el capítulo 3.

A destacar el estudio en disolución realizado⁶⁸ sobre un pentasacárido (figura 9) que constituye la estructura lineal conservada de los GPIs de anclaje.

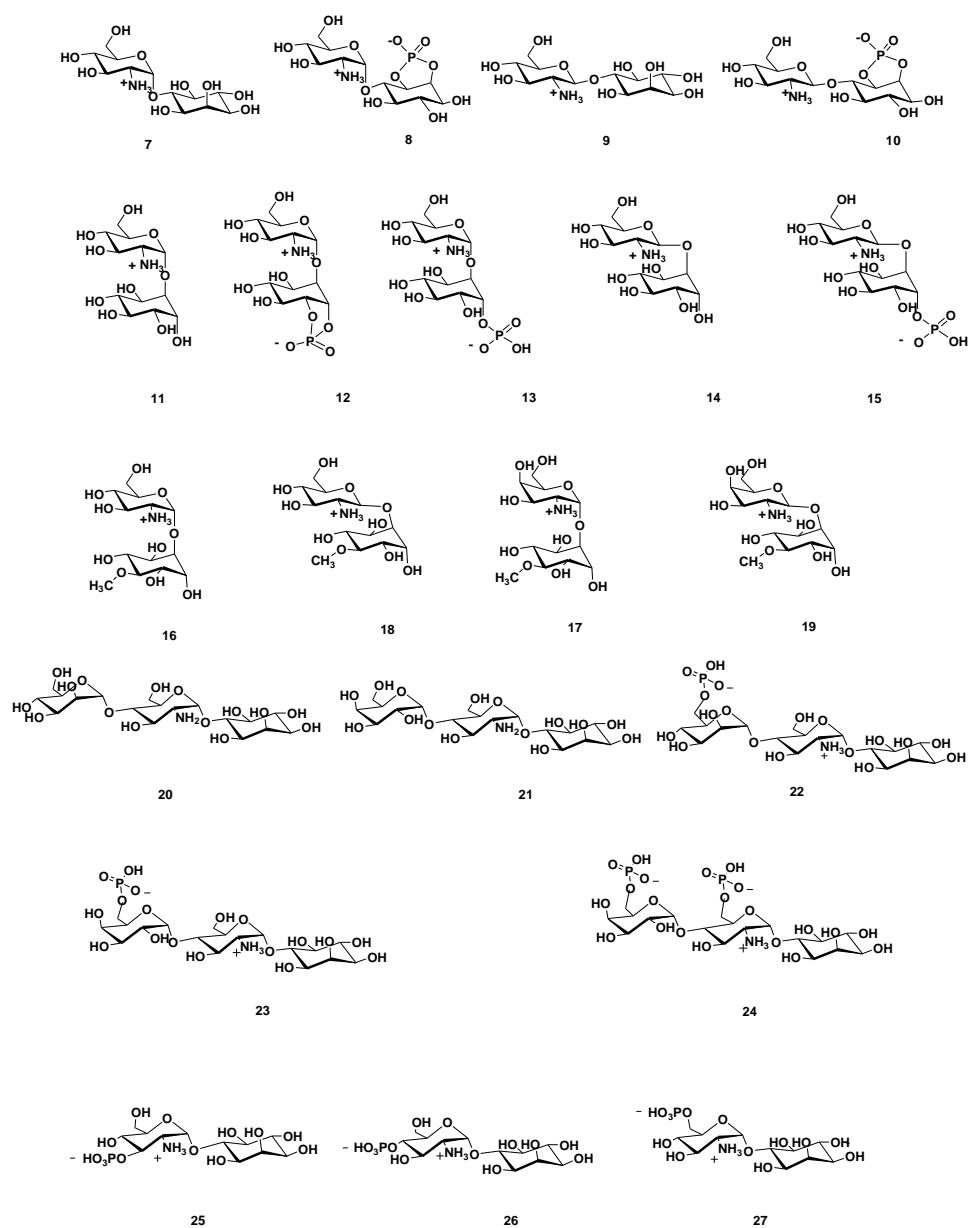


Figura 9. Estructura de los compuestos 7-27 modelos de IPGs que se estudiarán en la presente tesis doctoral.

1.5.-BIBLIOGRAFIA.

a) Reports issued by iupac-iub commission on biochemical nomenclature. *Pure Appl Chem.* **1974**, 40, (3), 277-331. b) Report of iupac commission on nomenclature of organic-chemistry and iupac-iub commission on biochemical nomenclature. *Pure Appl Chem.* **1974**, 37, (1-2), 283-297.

² Posternak, S. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1919**, 169, 138-140. b). Posternak, Th. *Chemistry of the Cyclitols_The Cyclitols* **1965**, Hermann, Paris. c) Billington, D.C. *The Inositol Phosphates*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1993**.

³ a) Ferguson, M.A.J.; Williams, A.F. *Annu Rev Biochem.* **1988**, 57, 285-320 b) Ferguson, M.A.J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, 1, 522-529. c) Mcconville, M.J.; Ferguson, M.A.J. *Biochem J.* **1993**, 294, 305-324 d) Ferguson, M.A.J.; Homans, S. W.; Dwek, R.A.; Rademacher, T.W. *Science.* **1988**, 239, 4841, 753-759.

⁴ Ikezawa, H. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* **2002**, 25, (4), 409-417.

⁵ a) Schneider, P.; Ferguson, M.A.J.; McConville, M.J.; Mehlert, A.; Homans, S.W.; Bordier, C.J. *Biol. Chem.* **1990**, 265, 16955-16964. b) Field, M.C.; Menon, A.K.; Cross G.A.M. *EMBO J.* **1991**, 10, 2731-2739. c) Deeg, M.A.; Humphrey, D.R.; Yang, S.H.; Ferguson, T.R.; Reinhold, V.N.; Rosenberry, T.L. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 18573-18580. d) Haynes, P.A.; Gooeley, A.A.; Ferguson, M.A.J.; Redmon, J.W.; William, K.L. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 216, 729-737. e) Redman, C.A.; Thoms-Oates, J.E.; Ogata, S.; Ikehara, Y.; Ferguson, M.A.J. *Biochem. J.* **1994**, 302, 861-865. f) Brewis, I.A.; Ferguson, M.A.J.; Mehlert, A.; Turner, A.J.; Hooper, N.M.J. *Biol. Chem.* **1995**, 270, 22946-22956. g) Mukasa, R.; Umeda, M.; Endo, T.; Kubala, A.; Inouek, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 318, 182-190. h) Azzouz, N.; Striepen, B.; Gerold, P.; Capdeville, Y.; Schwarz, R.T. *EMBO J.* **1995**, 14, 4422-4433. i) Treumann, A.; Lifely, M.R.; Schneider, P.; Ferguson, M.A.J. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 6088-6099. j) Gerold, P.; Boris, S.; Reitter, B.; Geyer, R.; Reinwald, E.; Risse, H.J.; Schwarz, R.T. *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 181-194.

⁶ a) Berridge, M.J. *Biochemistry.* **1984**, 220, 345-360. b) Nishizuka, Y. *Science.* **1992**, 258, 607-614. c) Berridge, M.J. *Nature* **1993**, 361, 315-325. d) Bruzik, K.S.; Tsai, M.D. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 49-72. d) Williams, R.L. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1441, 255-267. e) Berridge, M. J. *Nature.* **1993**, 361, (6410), 315-325. f) Bruzik, K. S.; Hakeem, A. A.; Tsai, M. D. *Biochemistry* **1994**, 33, (27), 8367-8374. g) Williams, R.L. *Bba-Mol. Cell. Biol. L.* **1999**, 1441, (2-3), 255-267.

⁷ a) Kuppe, A.; Evans, L.M.; McMillen, D.A.; Griffith, I.H. *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 6077-6083. b) Morris, J.C.; Lei, P.S.; Shen, T.Y.; Mensawilmot, K. *J. Biol CHem.* **1995**, 270, (6), 2517-2524.

⁸ Nicola, N. *Guidebook to Citokines and their Receptors* (Nicola N., ed.). Oxford University Press, Oxford. **1994**, 1-7.

⁹ Roth, R.A.; Cassell, D.J. *Science.* **1983**, 219, 4582, 299-301.

- ¹⁰ Jacobs, S.; Cuatrecasas, P. *Endocr. Rev.* **1981**, 2, (3), 251-263.
- ¹¹ a) Frattali, A.L.; Treadway, J.L.; Pessin, J.E. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 27, 19521-19528.
- ¹² Rosen, O.M. *Diabetes*. **1989**, 38, 12, 1508-1511.
- ¹³ a) Sun, X.J.; Rothenberg, P.; Kahn, C.R.; Backer, J.M.; Araki, E.; Wilden, P.A.; Cahill, D.A.; Goldstein, B.J.; White, M.F. *Nature*. **1991**, 352, 6330, 73-77. b) Sun, X.; Wang, L.M.; Zhang, Y.; Yenush, L.; Myers, M.G.Jr.; Glasheen, E.; Lane, W.S.; Pierce, J.M.; White, M.F. *Nature*. **1995**, 377, 173-177. c) Lavan, B.E.; Lane, W.S.; Lienhard, G.E. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 11439-11443. d) Lavan, B.E.; Fantin, V.R.; Chang, E.T.; William, S.L.; Keller, S.R.; Lienhard, G.E. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 21403-21407.
- ¹⁴ Pelicci, G.; Lanfranccone, L.; Grignani, F.; McGlade, J.; Cavallo, F.; Forni, G.; Nicoletti, I.; Grignani, F.; Pawson, T.; Pelicci, P.G. *Cell*. **1992**, 70, (1), 93-104.
- ¹⁵ a) Waters, S.B.; Pessin, J.E. *Trends Cell Biol.* **1996**, 6, 1, 1-4. b) Saltiel, A.R.; Pessin, J.E. *Trends Cell Biol.* **2002**, 12, (2), 65-71.
- ¹⁶ Cheatman, B.; Kahn, C.R. *Endocr. Rev.* **1995**, 16, 117-142.
- ¹⁷ Sheperd, P.; Nave, B.; O'Rahilly, S. *J. Mol. Endocr.* **1996**, 17, 175-184.
- ¹⁸ Strålfors, P. *Bioessays*. **1997**, 19, 327-335.
- ¹⁹ Calera, M.R.; Martínez, C.; Liu, H.; Amr, K.E.J.; Birnbaum, M.J.; Pilch, P.F. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 7201-7204.
- ²⁰ Larner, J. *Diabetes*. **1972**, 21 (2 Suppl.), 428-438.
- ²¹ a) Ferguson, M.A.J. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, 20, 243-256. b) Gaulton, G.N.; Pratt, J.C. *Semin. Immunol.* **1994**, 6, 97-104. c) Kunjara, K.; Caro, H.N.; McLean, P.; Rademacher, T.W. *Biopolymers & Bioproducts* (Svali J., ed.). **1995**, 301-305. d) Varela-Nieto, I.; León, Y.; Caro, H.N. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **1996**, 115, 223-241. e) Field, M.C. *Glycobiology*. **1997**, 7, 161-168. f) Jones, D.R.; Ávila, M.A.; Sanz, C.; Varela-Nieto, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 233, 432-437. g) Strålfors, P. *Bioessays*. **1997**, 19, 327-335. h) Jones, D.R.; Varela-Nieto, I. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **1998**, 30, 313-326. i) Frick, W.; Bauer, A.; Bauer, J.; Wied, S.; Müller, G. *Biochemistry*. **1998**, 37, 13421-13436. j) Jones, D.R.; Varela-Nieto, I. *Mol. Med.* **1999**, 5, 505-514. k) Larner, J.; Huang, L.C. *Diabetes Rev.* **1999**, 7, 217. l) Campbell, A.S. *Glycoscience* (Fraser-Reid B.; Tatsuta, K.; Thiem, J., ed.). **2001**, 2, 1695-1777. m) Ikezawa, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, (4), 409-417.
- ²² a) Berridge, M.J. *Biochemistry*. **1984**, 220, 345-360. b) Nishizuka, Y. *Science*. **1992**, 258, 607-614. c) Berridge, M.J. *Nature*. **1993**, 361, 315-325. d) Bruzik, K.S.; Tsai, M.D. *Bioor. Med. Chem.* **1994**, 2, 49-72.

- ²³ Larner, J.; Huang, L.C.; Schwarz, C.F.; Oswald, A.S.; Shen, T.Y.; Kinter, M.; Tang, G.Z.; Zeller, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *151*, 1416-1426.
- ²⁴ Mato, J.M.; Kelly, K.L.; Abler, A.; Jarret, L. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 2131-2137.
- ²⁵ a) Rademacher, T.W.; Caro, H.N.; Kunjara, S.; Wang, D.Y.; Greenbaun, A.L.; McLean, P. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1994**, *27*, 327-341. b) Caro, H.N.; Kunjara, S.; Rademacher, T.W.; León, Y.; Jones, D.R.; Ávila, M.A.; Varela-Nieto, I. *Biochem. Mol. Med.* **1997**, *61*, 214-228.
- ²⁶ a) Jones, D.R.; Varela-Nieto, I. *Mol. Med.* **1999**, *5*, 505-514. b) Kunjara, S.; Wang, D.Y.; Greenbaun, A.L.; McLean, P.; Kurtz, A.; Rademacher, T.W. *Mol. Gen. Metabol.* **1999**, *68*, 488-502.
- ²⁷ a) Larner, J.; Huang, L.C.; Tang, G.; Suzuki, S.; Schwarz, C.F.W.; Romero, G.; Roulidis, X.; Zeller, K.; Shen, T.W.; Oswald, A.S.; Lutterell, L. *Cold Spring Harbor Symp.* **1988**, *53*, 965-971. b) Romero, G. *Cell. Biol. Int. Rep.* **1991**, *15*, 827-852. c) Romero, G.; Larner, J. *Adv. Pharmacol.* **1993**, *24*, 21-50. d) Rademacher, T.W.; Caro, H.N.; Kunjara, S.; Wang, D.Y.; Greenbaum, A.L.; McLean, P. *Braz. J. Med. Biol.* **1994**, *27*, 327-341. e) Varela-Nieto, I.; León, Y.; Caro, H.N. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **1996**, *115*, 223-241.
- ²⁸ a) Romero, G.; Luttrell, L.; Rogol, A.; Zeller, K.; Hewlett, E.; Larner, J. *Science.* **1988**, *240*, 509-511. b) Müller, G.; Wield, S.; Crecelius, A.; Kessler, A.; Eckel, J. *Endocrinology.* **1997**, *138*, 3459-3475.
- ²⁹ Larner, J.; Price, J.D.; Heimark, D.; Smith, L.; Rule, G.; Piccariello, T.; Fonteles, M.C.; Pontes, C.; Vale, D.; Huang, L. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3283-3291.
- ³⁰ Taylor, S.S.; Buechler, J.A.; Yonemoto, W. *Ann. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 971-1005.
- ³¹ a) Knighton, D.R.; Zheng, J.H.; Ten, Eyck L.F.; Xuong, N.H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Science.* **1991**, *253*, 407-414. b) Knighton, D.R.; Zheng, J.H.; Ten Eyck, L.F.; Xuong, N.H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Science*, **1991**, *253*, 414-420.
- ³² Lawson, J.E.; Niu, X.D.; Browning, K.S.; Le, Trong H.; Yan, J.; Reed, L.J. *Biochemistry.* **1993**, *32*, 8987-8993.
- ³³ Ke, H.M.; Zhang, Y.P.; Lipscomb, W.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 5243-5247.
- ³⁴ von der Lieth, C-W.; Kóza, T.; Hull, W.E. *J. Mol. Struct. Theochem.* **1997**, *395-396*, 225-244.
- ³⁵ a) Jiménez-Barbero, J.; Noble, O.; Pfeffer, C.; Pérez, S. *New. J. Chem.* **1988**, *12*, 941. b) French, A.D. *Biopolymers.* **1988**, *27*, 1519. c) Ha, S.N.; Madsen, L.J.; Brady J.W. *Biopolymers.* **1988**, *27*, 1927. d) Tran, V.; Buleon, A.; Imbert, A. *Biopolymers.* **1989**, *28*, 679. e) Imbert, A.; Tran, V.; Pérez, S. *J. Comput. Chem.* **1989**, *11*, 205. f) Jiménez-Barbero, J.; Roupe, C.B.; Rochas, C.; Pérez, S. *J. Biol. Macromol.* **1989**, *11*, 265. g) Jimenez-Barbero, J.; Peters, T. *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*, VCH. Weinheim, **2003**.

- ³⁶ French, A.D.; Brady, J.W. *ACS Symp. Ser.* **1990**, 430.
- ³⁷ a) Wolfe, S.; Whangbo, M.-H.; Mitchell, D.J. *Carbohydr. Res.* **1979**, 69, 1. b) Thatcher, G.R.J. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*, A.C.S. Washington. **1993**.
- ³⁸ a) Lemieux, R.U.; Bock, K.; Delbaere, L.T.J.; Koto, S.; Rao, V.S. *Can. J. Chem.* **1980**, 58, 631. b) Praly, J.P.; Lemieux, R.U. *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 213. c) Thorgensen, H.; Lemieux, R.U.; Bock, K.; Mayer, B. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 44.
- ³⁹ Pophristic, V. Goodman, L. *Nature.* **2001**, 411, 565-568.
- ⁴⁰ Schreiner, P.R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3579-3581.
- ⁴¹ Jansson, P.E.; Kenne, L.; Wildmalm, G. *Carbohydr. Res.* **1987**, 168, 67-77.
- ⁴² Lemieux, R.U.; Kullnig, R.K.; Bernstein, H.J.; Schneider, W.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6098-6105.
- ⁴³ Bock, K.; Pedersen, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1974**, 2, 293-297.
- ⁴⁴ Vliegthart, J.F.G.; Dorland, L.; van Halbeek, H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, 41, 209-374.
- ⁴⁵ van Kuik, J.A.; Vliegthart, J.F.G. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1991**, 3, 229-230.
- ⁴⁶ van Kuik, J.A.; Hård, K.; Vliegthart, J.F.G. *Carbohydr. Res.* **1992**, 235, 53-68.
- ⁴⁷ Boubet, S.; Bock, K.; Smith, D.; Darvill, A.; Albersheim, P. *Trends Biochem. Sci.* **1989**, 14, 475-477.
- ⁴⁸ Norwood, T.J.; Boyd, J.; Heritage, J.E.; Soffe, N.; Campbell, L.D. *J. Magn. Reson.* **1990**, 87, 488-501. b) Köver, E.; Hruby, V.J.; Uhrin, D.J. *J. Magn. Reson.* **1997**, 129, 125-129. c) de Beer, T.; van Zuylen, C.W.E.M.; Hard, K.; Boelens, R.; Kaptein, R.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F.G. *FEBS Lett.* **1984**, 348, 1-6.
- ⁴⁹ a) Lerner, L.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1986**, 69, 375-380. b) Cavanagh, J.; Palmer, A.G.; Wright, P.E.; Rance, M. *J. Magn. Reson.* **1991**, 91, 429-436.
- ⁵⁰ de Vaard, P.; Boelens, R.; Vuister, G.W.; Vliegthart, J.F.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3232-3234.
- ⁵¹ a) Bricher, H.R.; Müller, C.; Bigler, P. *J. Magn. Reson.* **1990**, 89, 146-152. b) Sabesan, S.; Duus, J.Ø.; Fukunaga, T.; Bock, K.; Ludvigsen, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3236-3246. c) Scott, K.; Keeler, J.; Van, Q.N.; Shaka, A.J. *J. Magn. Reson.* **1997**, 125, 302-324.
- ⁵² Stott, K.; Keeler, J. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, 34, (7), 554-558..

- ⁵³ a) Bush, C.A.; Cagas, P. *Adv. Biophys. Chem.* Vol 2. JAI Press **1991**. b) Poppe, L.; Von der Lieth, C.W.; Dabrowski, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7762. c) Scardale, J.N.; Prestegard, J.H.; Yu, R.K. *Biochemistry*. **1990**, 29, 9843. d) Bock, K. *Pure. App. Chem.* **1983**, 55, 605.
- ⁵⁴ Dios, A.C.; Pearson, J.G.; Oldfield, E. *Science*. **1993**, 55, 1491.
- ⁵⁵ a) Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870. b) Tvaroska, I.; Hricovini, M.; Petrakova, E. *Carbohydr. Res.* **1989**, 189, 359. c) Tvaroska, I.; Taravel, F.R. *J. Biomol. NMR.* **1992**, 2, 421. d) Haasnoot, C.A.G.; de Leeuw, F.A.A.M.; Altona, C. *Tetrahedron*. **1980**, 36, 2783.
- ⁵⁶ Neuhaus, D.; Williamson, M.P. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCH Publisher, New York, **1989**.
- ⁵⁷ Canales, A.; Jiménez-Barbero, J.; Martín-Pastor, M. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, 50, (1), 80-85.
- ⁵⁸ Macura, S. Ernst, R.R. *Mol. Phys.* **1980**, 41, 95-117.
- ⁵⁹ Ernst, R.R.; Bodenhausen, G. Wokaun, A. *Principles of Nmr in one and two dimensions*. Clarendon Press, Oxford. **1987**.
- ⁶⁰ Aubin, Y.; Prestegard, J. H. *Biochemistry*. **1993**, 32, 3422-28.
- ⁶¹ Tjandra, N.; Bax, A. *Science*. **1997**, 278, 1111-14.
- ⁶² Bock, K. *Pure. Appl.Chem.* **1983**, 55, 605.
- ⁶³ a) Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J. *Biopolymers*. **1995**, 35, 55. b) Homans, S.W. *Biochemistry*. **1990**, 29, 9110. c) Acquott,i D.; Cantu, L.; Ragg, E.; Sonnino, S. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 225, 271.
- ⁶⁴ Edinger, S.R.; Cortis, C.; Shenkin, P.S.; Friesner, R.A. *J. Phys. Chem B.* **1997**, 101, 1190-1197.
- ⁶⁵ Metropolis, N.; Rosenbluth, A.W. Rosenbluth, M.N.; Teller, A.H.; Teller, E. *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 1087-1092.
- ⁶⁶ a) Verlet, L. *Phys. Rev.* **1967**, 159, 98. b) Harvey, S.C.; McCammon, J.A. *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, **1987**.
- ⁶⁷ Widmalm, G.; Pastor, R.W. *J. Chem. Soc. Faraday. Transactions.* **1992**, 88, 1747-1754
- ⁶⁸ Martín-Lomas, M.; Khair, N.; García, S.; Koessler, J-L.; Nieto, P.M.; Rademacher, T.W. *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, (19), 3608-3621.

CAPITULO 2

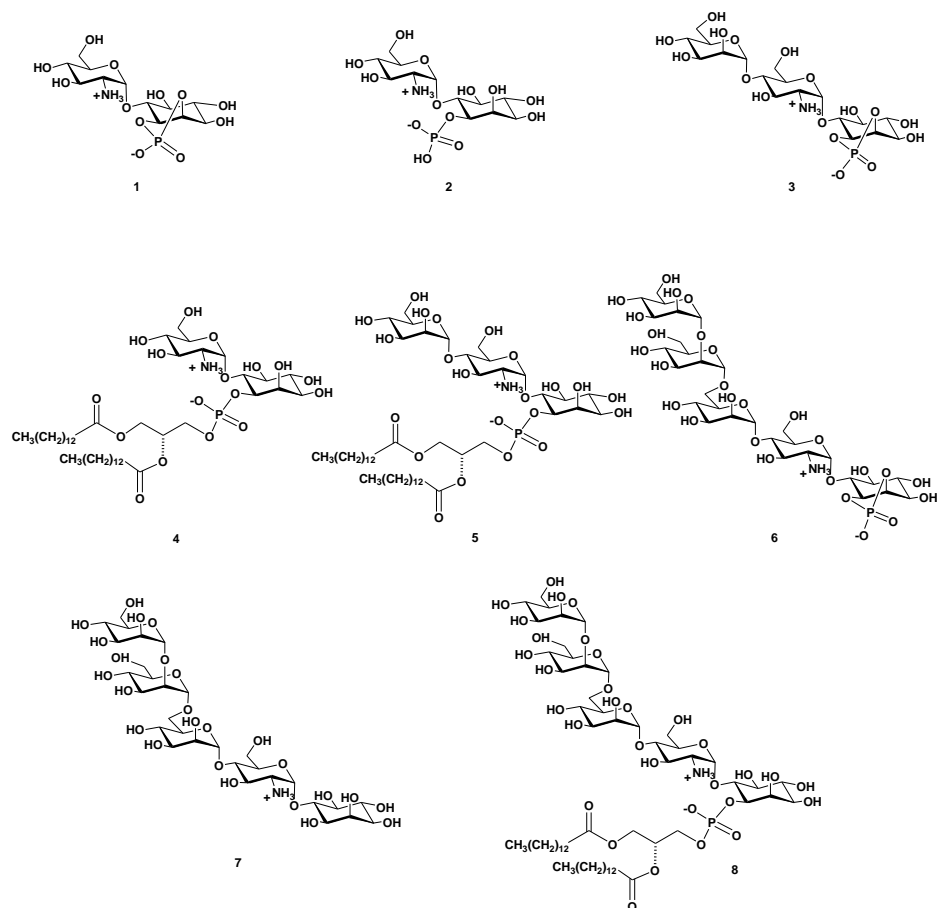
ESTUDIOS DE PSEUDODISACÁRIDOS MIMÉTICOS DE IPG.

2.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE IPG: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

Los inositolfosfoglicanos (IPGs) se caracterizan, desde el punto de vista de su composición, por la presencia en su extremo reductor de un residuo de inositol glicosilado por una hexosamina. En el momento de comenzar los trabajos recogidos en la presente memoria existían pocos antecedentes de estudios estructurales de pseudoligosacáridos que contuvieran esta entidad, probablemente debido a la escasez y dificultad de aislamiento de este material. De hecho, los primeros estudios estructurales de este tipo de esta entidad fueron realizados sobre glicosilfosfatidil inositoles (GPIs) de membrana naturales que contienen esta estructura en su esqueleto común y son más abundantes en la naturaleza.¹ Sin embargo, estos estudios se han centrado más en la estructura y/o dinámica global del oligosacárido sin analizar en detalle el motivo hexosamina-ciclitol.

Esta estructura ha sido analizada en más detalle en estudios posteriores sobre estructuras sintéticas de IPGs, realizados principalmente en nuestro grupo (Esquema 2.1).^{2,3,4} El primer estudio, dirigido por Jiménez-Barbero, consistió en el análisis detallado mediante RMN y modelado molecular de los compuestos **1** - **5**, que contienen la estructura glucosaminil α (1 \rightarrow 6)-D-*mio*-inositol. En este trabajo se concluyó que estos motivos presentaban un conformero mayoritario de tipo *syn-Ψ* en equilibrio rápido con otro minoritario de tipo *anti-Ψ*. Interesantemente, en el caso de **2**, la presencia de un grupo fosfato libre próximo a la carga complementaria de la glucosamina estabiliza el conformero *syn-Ψ* haciendo experimentalmente indetectable la forma *anti-Ψ*. Este resultado sugería un fuerte control de la estructura tridimensional de estos compuestos por parte de la disposición relativa de los sustituyentes cargados. Esta hipótesis resultaba atractiva en el contexto del proyecto global, puesto que la dependencia de la estructura tridimensional de pequeños cambios en la sustitución podría ser un mecanismo de modulación de la potencial actividad de estos compuestos. Por ello, durante esta tesis se prestó especial atención a la influencia de los estados de ionización de los grupos fosfato y amonio en el comportamiento conformacional de los compuestos estudiados.

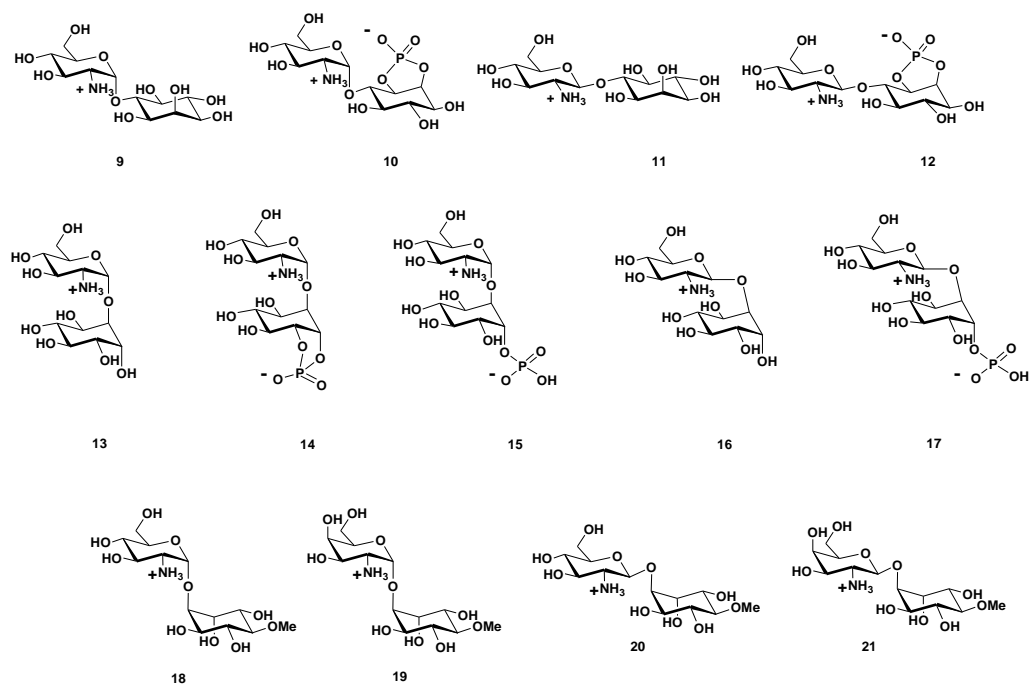
En otros trabajos se considera la naturaleza lipídica de **4**, **5** y **8** y se han estudiado las propiedades conformacionales de estos compuestos en medios micelares. En general, los resultados de estos trabajos son similares a los obtenidos para los compuestos libres. Los detalles concretos se discutirán con más detalle a lo largo de este capítulo cuando sea necesario para la discusión de los resultados.^{2 y 5}



Esquema 2.1. Compuestos conteniendo el motivo estructural glucosamina α (1 \rightarrow 6)-D-mio-inositol, estudiados por nuestro grupo.

Dentro del proyecto global y como continuación a estos trabajos preliminares se prepararon, en el laboratorio de síntesis del grupo, nuevas series de potenciales análogos de IPGs, ⁵⁻²⁰ que contenían *mio*-inositol, *quiro*-inositol o pinitol, con diversas estereoquímicas y sustituyentes, en cantidades y pureza suficientes como para permitir el estudio de su estructura por RMN (Esquema 2.2).²¹⁻²⁴ Estos compuestos representaban los potenciales IPGs naturales generados por la acción de fosfolipasas C o D sobre hipotéticos GPIs de membrana (véase el Capítulo 1). De esta manera el estudio preliminar del motivo estructural glucosamina α (1 \rightarrow 6)-D-*mio*-inositol, ha sido continuado con el de los compuestos: 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*mio*-inositol **9**, 2-amonio-2-desoxi- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-L-*mio*-

inositol-1,2-fosfato cíclico **10** y sus análogos con configuración β : 2-amonio-2-desoxi- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*mio*-inositol **11** y 2-amonio-2-desoxi- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-L-*mio*-inositol-1,2-fosfato cíclico **12**. El compuesto **9** sería el producto esperado de la hidrólisis de **5** por acción de una fosfolipasa D. Se ha sugerido que el compuesto **10** participa en procesos de señalización de la insulina.²⁵ Además, contiene el mismo el mismo motivo estructural que **1** pero con configuración L en la parte del ciclitol (ó enlace glicosídico α 1 \rightarrow 4 en las series D) por lo que es interesante para el estudio del papel de la interacción entre cargas en una posible selección conformacional.



Esquema 2.2. Compuestos estudiados en el presente capítulo.

En este capítulo, también se ha estudiado el comportamiento de compuestos análogos que contienen D-*quiro*-inositol, tanto en configuración α como β y conteniendo o no grupos fosfato libres o cíclicos (Esquema 2.2): O-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol **13**, O-2-amonio-2-desoxi- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol-1,2-fosfato cíclico **14**, O-2-amonio-2-desoxi- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol-1-fosfato **15**, O-2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol **16** y 2-amonio-2-desoxi-

β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol-1-fosfato **17**. En este conjunto, se introduce, respecto a la serie anterior una nueva estereoquímica en la unión hexosamina ciclitol, que ahora se hace a través de una unión axial.

Por último, se han analizado los derivados de pinitol **18 - 21**, cuya estereoquímica es similar a los compuestos con D-*quiro*-inositol, pero conteniendo un grupo metilo en posición 3 en el anillo de ciclitol: 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol **18**, 2-amino-2-desoxi- α -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol **19**, 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol **20**, 2-amino-2-desoxi- β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 6)-D-*quiro*-inositol **21**. En el caso de **19** y **21**, además se ha variado la naturaleza de la hexosamina, sustituyendo la glucosamina por galactosamina. Por ello, estos compuestos permitirán evaluar la influencia sobre la estructura tridimensional de las variaciones en la estereoquímica y la sustitución en zonas lejanas al enlace glicosídico.

2.2.- METODOLOGÍA DE ESTUDIO

2.2.1.- Resonancia Magnética Nuclear.

Los compuestos **9-17** contienen grupos ionizables, por ello, se tuvo especial precaución en la elección y ajuste del pH de las muestras con el fin de mantenerlo suficientemente alejado de los puntos de equivalencia y así evitar mezclas de especies. Por ello se realizaron valoraciones ácido-base de todos los compuestos estudiados. Siempre que fue posible, se eligieron condiciones de trabajo en la zona neutra para evitar posibles hidrólisis, tanto de los grupos fosfato como del enlace glicosídico. Esta condición implicaba necesariamente trabajar por debajo del pKa de la amina y por encima del segundo pKa del grupo fosfato. Por lo demás no se tomaron precauciones especiales, salvo las típicas en RMN de carbohidratos que consistieron en el intercambio de los protones lábiles por deuterio mediante sucesivos ciclos de liofilización y disolución en D₂O.

Los espectros han sido realizados utilizando técnicas bidimensionales convencionales empleando gradientes de campo siempre que fue posible, COSY,²⁶ TOCSY,²⁷ NOESY²⁸, ROESY,²⁹ y HMQC³⁰ o HSQC³¹. Las distancias interprotónicas experimentales se evaluaron a partir de las correspondientes constantes de relajación cruzada longitudinal (σ^{NOE}) o transversal (σ^{ROE}) empleando distancias conocidas como referencia interna. Estas, a su vez, fueron calculadas a partir de la dependencia del efecto NOE o ROE con el tiempo de mezcla asumiendo la aproximación de espines aislados.³² Para la cuantificación experimental de estas

velocidades de crecimiento del NOE, siempre que fue posible, se emplearon experimentos selectivos monodimensionales sobre la señal del protón anomérico de la glucosamina. Estos experimentos se efectuaron empleando el esquema de selección propuesto por Shaka mediante doble eco de espín y gradientes pulsados de campo (*dpgse* 'double pulsed field gradient spin echo') y permiten el registro de experimentos NOESY con mayor sensibilidad y resolución que sus análogos bidimensionales (Figura 2.1).³³

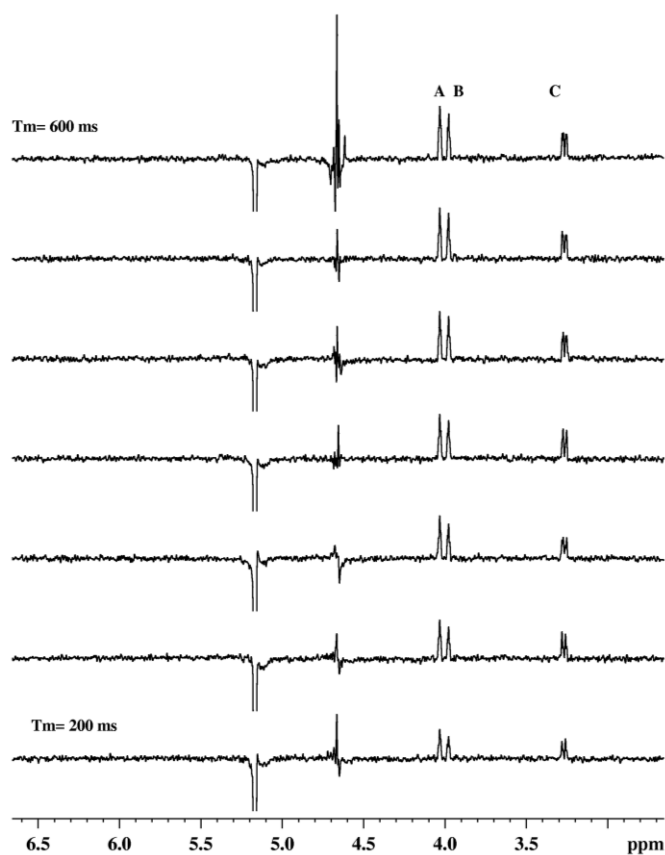


Figura 2.1. Serie de espectros Selecciónando el protón anomérico *dpgse*-NOESY realizados a diferentes tiempos de mezcla (desde 200 hasta 600 ms).

2.2.2.- CALCULOS TEÓRICOS DE CAMPOS DE FUERZAS.

Los análisis conformacionales teóricos de los compuestos **7-19**, se realizaron mediante cálculos de campos de fuerza empleando técnicas de mecánica y dinámica molecular. Estos compuestos, además de un esqueleto de tipo carbohidrato, contienen grupos cargados, lo supone una dificultad añadida a este tipo de análisis. Estas restricciones limitaban la elección del campo de fuerzas ya que éste debería modelar adecuadamente características propias de los carbohidratos,³⁴ al mismo tiempo que deberían estar adecuadamente parametrizados los grupos fosfato y amonio.

Por lo tanto, de los campos de fuerza accesibles en nuestro grupo en el momento de la realización de esta tesis: MM2* (modificación MM2 de 1987),³⁵ MM3* (modificación MM3 de 1991),³⁶⁻³⁹ AMBER* (modificación AMBER de 1984 y 1986),⁴⁰⁻⁴³ OPLSA* (modificación OPLS/A de 1991)⁴⁴⁻⁴⁶ y por último MMFF implementados en Macromodel (versiones 5.5 y 6.0);⁴⁷⁻⁵³ MM2, MM3, MMFF94⁴⁷⁻⁵³, AMBER^{36, 42} y TRIPOS⁵⁴ incluidos originalmente en Sybyl, y otros adaptados por Imberty et al.,⁵⁵ para el análisis conformacional de carbohidratos, pocos eran válidos en nuestro caso. Únicamente AMBER* presentaba simultáneamente parámetros específicos de alta calidad para carbohidratos y ésteres fosfóricos. Por otro lado, el campo de fuerzas AMBER (incluyendo parámetros de Homans) en su adaptación a Insight II/DISCOVER 94.0, se había empleado previamente en el estudio de las estructuras **1-3**² aunque no estaba disponible en nuestro grupo.

Dados estos antecedentes se decidió utilizar MACROMODEL con el campo de fuerzas AMBER*. Esta implementación permitía optar entre dos reparametrizaciones específicas para carbohidratos: la de Homans de 1990⁵⁶ y la más moderna de Still et al.^{40, 57}. La primera fue generada ampliando los parámetros de Ha et al.⁵⁸ existentes para monosacáridos, basándose en cálculos *ab initio* del dimetoximetano⁵⁹. La segunda es mucho más moderna (1996), ha sido desarrollada *de novo* a partir de cálculos de orbitales moleculares *ab initio* sobre modelos de piranosas,^{40, 60, 61} y optimizada para el modelo continuo de disolvente GB/SA^{62, 63}. En general se empleó la versión de Still debido a que fue la más precisa en un estudio comparativo previo (Apéndice 1) probablemente por derivar de métodos de cálculo más sofisticados. En ciertos casos en los que se consideró interesante, se contrastaron los resultados de esta parametrización con la de Homans.

Los cálculos de mecánica molecular consistieron en el estudio sistemático del espacio conformacional usando mapas adiabáticos de tipo Ramachandran del enlace glicosídico o mediante simulaciones de dinámica molecular examinando esencialmente el mismo elemento.

Mapas Adiabáticos

Al ser el enlace glicosídico el principal punto de flexibilidad de los carbohidratos y asumiendo que los residuos que forman parte de un determinado enlace glicosídico son rígidos, se puede suponer que la geometría global de los confórmeros de baja energía, dependerá principalmente de las rotaciones en torno a los enlaces glicosídicos (Φ, Ψ). Por ello, para explorar el espacio conformacional accesible de los disacáridos objeto de nuestro estudio **7-19**, se realizó una búsqueda sistemática alrededor de estos enlaces.⁶⁴⁻⁶⁶ Se han generado el colectivo de confórmeros representativos de todo el espacio conformacional (Φ, Ψ) mediante la variación sistemática de dichas torsiones, en pequeños incrementos $\Delta\alpha$ sobre el intervalo total de 360° (mapas rígidos). Posteriormente, se obtuvieron los mapas relajados por minimización de la energía de todos los grados de libertad excepto en las torsiones directoras (Φ, Ψ). Estos describen más ampliamente la superficie de energía potencial accesible, disminuyendo las barreras entre mínimos relativos, y localizando mínimos de energía menores que la/s estructura/s de partida. Sin embargo, a pesar de la mayor eficacia en la localización de las regiones de mínima energía, los mapas no consideran el problema de “mínimos múltiples” (ver capítulo 1), y para un punto dado (Φ, Ψ) del espacio conformacional descrito por el mapa relajado es posible que se puedan producir aún, conformaciones de menor energía por rotación de los grupos exocíclicos. Por esto se han construido los correspondientes mapas adiabáticos, mediante una variación sistemática de todas las posibles combinaciones de orientaciones de todos los grupos exocíclicos presentes en los compuestos analizados. Si asumimos que cada grupo exocíclico puede encontrarse mayoritariamente en cada una de las 3 conformaciones “alternadas”, habría que generar $3N$ conformaciones diferentes para cada punto del espacio (Φ, Ψ), siendo N el número de grupos exocíclicos. En general, se han considerado los rotámeros (*gg*, *gt*, y *tg*) del grupo hidroximetilo de la hexosamina y también posibles orientaciones de los grupos fosfato y metilo.

En nuestro caso, para reducir el coste computacional, se han considerado solo las disposiciones de los grupos hidroxilos secundarios que den lugar a un mayor número de enlaces de hidrógeno, y para ello, los OH- secundarios se orientan bien en sentido de las manecillas del reloj (sentido clockwise) o bien en sentido contrario (anticlockwise). Se ha empleado este tipo de aproximación, porque al tratarse de carbohidratos de un tamaño y flexibilidad limitados, el tiempo computacional no es excesivo y en este tipo de aproximaciones constituye una de las formas más eficaces de reducir el coste computacional, manteniendo la seguridad de que se exploraran las configuraciones del sistema de mayor sentido físico-químico.

Dinámicas Moleculares (DM).

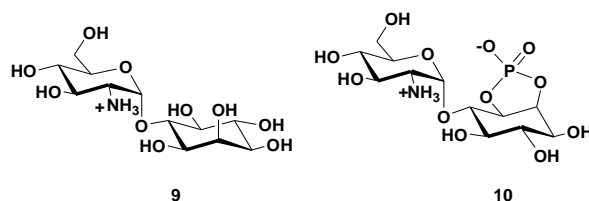
Como complemento al análisis sistemático empleando mapas adiabáticos (Φ, Ψ), se realizaron en los casos de los compuestos **18-21** simulaciones de dinámica molecular. Esta alternativa, al permitir la obtención de información adicional acerca de la dinámica y flexibilidad de los compuestos estudiados, resultaba atractiva en las estructuras estudiadas en esta tesis doctoral. En primer lugar se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásica, NVT *in vacuo*,^{67, 68} de los compuestos **18-21**, empleando como estructuras de partida aquellas de mínima energía encontradas mediante búsqueda sistemática. Pero, sin duda como se describe más adelante, los mejores resultados se obtuvieron empleando dinámicas estocásticas o de Langevin.^{69, 70}

2.3.- RESULTADOS.

El estudio conformacional de los disacáridos **7-19** en disolución se ha llevado a cabo³ mediante una combinación de métodos experimentales de RMN y de cálculos teóricos de campos de fuerzas (mecánica y dinámica molecular). Ambas técnicas han sido completamente independientes en su adquisición. Es decir, en la realización de los cálculos no se han empleado restricciones derivadas de los datos experimentales. Durante el análisis de los resultados, las descripciones teóricas se han empleado para interpretar los resultados experimentales, y recíprocamente, los datos de RMN han sido utilizados para validar los resultados teóricos.

Para la presentación y discusión de los resultados que sigue, se han agrupado los pseudodisacáridos **7-19** de acuerdo con ‘*motivos estructurales*’ característicos, basándose en la stereoquímica del enlace glicosídico y en el isómero de inositol que lo compone. Así, la aplicación estos criterios produce seis motivos estructurales:

motivo estructural	compuestos
D-glucosamina α (1 \rightarrow 6) D- <i>mio</i> -inositol	9 y 10
D-glucosamina β (1 \rightarrow 6) D- <i>mio</i> -inositol	11 y 12
D-glucosamina α (1 \rightarrow 6) D- <i>quiro</i> -inositol	13, 14 y 15
D-glucosamina β (1 \rightarrow 6) D- <i>quiro</i> -inositol	16 y 17
D-hexosamina α (1 \rightarrow 6) D-pinitol	18 y 19
D-hexosamina β (1 \rightarrow 6) D-pinitol	20 y 21

2.3.1.- Motivo estructural glucosamina α (1 \rightarrow 6) *mio*-inositol.

La asignación completa de los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, de los disacáridos **9** y **10**, se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Desplazamientos químicos de ^1H (δ (ppm)) y ^{13}C (δ (ppm)) y constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ (Hz), en D_2O , de los compuestos **9** y **10** a 25°C y a 500 MHz.

	9		10			9		10	
	δ [^1H]	$^3J_{\text{H-H}}$	δ [^1H]	$^3J_{\text{H-H}}$		δ [^{13}C]		δ [^{13}C]	
Glucosamina									
H-1	5,16	3,67	5,63	3,76	C-1	100,3		95,5	
H-2	2,72	3,70/10,25	3,33	3,67/10,66	C-2	55,5		54,6	
H-3	3,54	9,70	4,01	9,14/10,69	C-3	74,0		69,8	
H-4	3,37	9,62	3,43	10,14/9,22	C-4	70,0		70,3	
H-5	3,95	9,55	4,24	2,68/5,75	C-5	72,8		72,3	
H-6	3,73	-	3,74	12,51/2,32	C-6	60,7		61,0	
H-6'	3,73	-	3,95	12,55/5,70					
Ciclitol									
H-1	3,67	2,60/9,74	3,56	3,04/9,92	C-1	71,9		70,9	
H-2	3,94	2,75/2,80	4,34	2,74/2,74	C-2	72,8		71,4	
H-3	3,45	2,80/10,05	4,09	8,72/2,68	C-3	71,3		73,6	
H-4	3,57	-	3,99	9,83/9,67	C-4	72,5		76,8	
H-5	3,29	9,11	3,55	9,47/9,47	C-5	73,3		75,3	
H-6	3,63	8,80	3,68	9,82/9,58	C-6	80,9		72,9	

Los valores en las constantes de acoplamiento, indican que el anillo de piranosa de ambos compuestos se encuentra en conformación de silla canónica $^4\text{C}_1$. Por el contrario, para el anillo de ciclitol del compuesto **10** indican una distorsión producida por el anillo de cinco miembros fusionado del fosfato cíclico.

Las superficies adiabáticas de los enlaces glicosídicos de **9** y **10** fueron construidas a partir de los correspondientes mapas relajados (36 y 12 respectivamente), siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2. Estos junto con los mapas de población y la superposición de las regiones de proximidad interprotónica predichos para los compuestos **9** y **10** se muestran en las figuras 2.2 y 2.3.

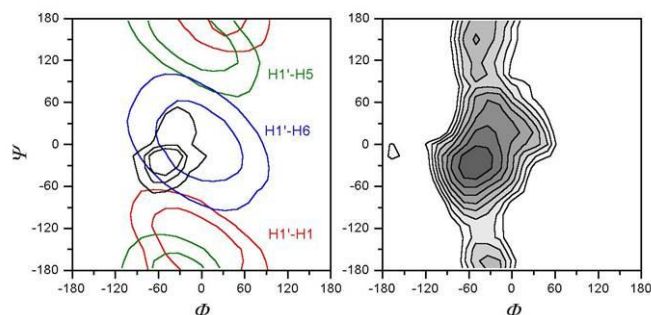


Figura 2.2. Mapa de energía adiabático (izda) calculado para el compuesto **9** y superposición de los NOEs predichos en el mapa de distribución de probabilidad conformacional (derecha). Los niveles de contornos se muestran cada 5KJ mol^{-1} para la energía, las distancias interprotónicas a 2,5 y 3 Å y los de probabilidad a 10, 5.5 y 1%.

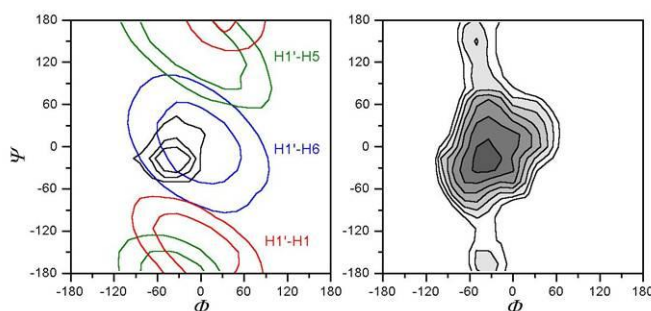


Figura 2.3. Mapa de energía adiabático (izda) calculado para el compuesto **10** y superposición de los NOEs predichos en el mapa de distribución de probabilidad conformacional (derecha). Los niveles de contornos se muestran cada 5KJ mol^{-1} para la energía, las distancias interprotónicas a 2,5 y 3 Å y los de probabilidad a 10, 5.5 y 1%.

En ambos casos las superficies adiabáticas predicen dos mínimos locales, uno absoluto situado en la zona central del mapa adiabático, de tipo *syn*- Ψ , y otro de menor energía en la zona *anti*- Ψ ($\Psi \pm 180^\circ$). Ambos están de acuerdo con la orientación predicha por el efecto exo-anomérico. Los mapas de distancias interprotónicas inferiores a 3 Å indican que mientras que el mínimo *syn*- Ψ se encontraría caracterizado por el NOE exclusivo H1'-H6; el mínimo *anti*- Ψ , por su parte lo sería por los NOEs H1'-H5 y H1'-H1.

En los experimentos NOESY y ROESY registrados para **9** y **10**, se aprecian simultáneamente los NOEs H1'-H6 y H1'-H5, indicando la coexistencia de ambos mínimos en disolución. El NOE H1'-H1, se pudo observar en el caso del compuesto **10**, pero no en el de **9** debido a solapamiento de señales. La mayor intensidad del NOE H1'-H6 respecto a H1'-H1 y

H1'-H5 para **10** indican una mayor población del mínimo *syn*- Ψ . En el caso de **9** la diferencia de desplazamiento químico entre las señales correspondientes a H1 y H6 es comparable a la constante de acoplamiento entre ambos lo que complicó este análisis. Con el fin de determinar cualitativamente cual de los dos NOEs exclusivos era mayoritario, se realizó un experimento HMQC-NOESY. Mediante este experimento (Figura 2.4) se pudo separar los picos de cruce por su frecuencia de carbono determinando sin dudas, la mayor intensidad del NOE H1'-H6 con respecto a H1'-H1. De esta manera, al menos cualitativamente se puede establecer que los compuestos **9** y **10**, presentan estructuras muy similares y sus estructuras tridimensionales, estarían descritas por un conformero mayoritario de tipo *syn*- Ψ en rápido intercambio con un conformero *anti*- Ψ minoritario.

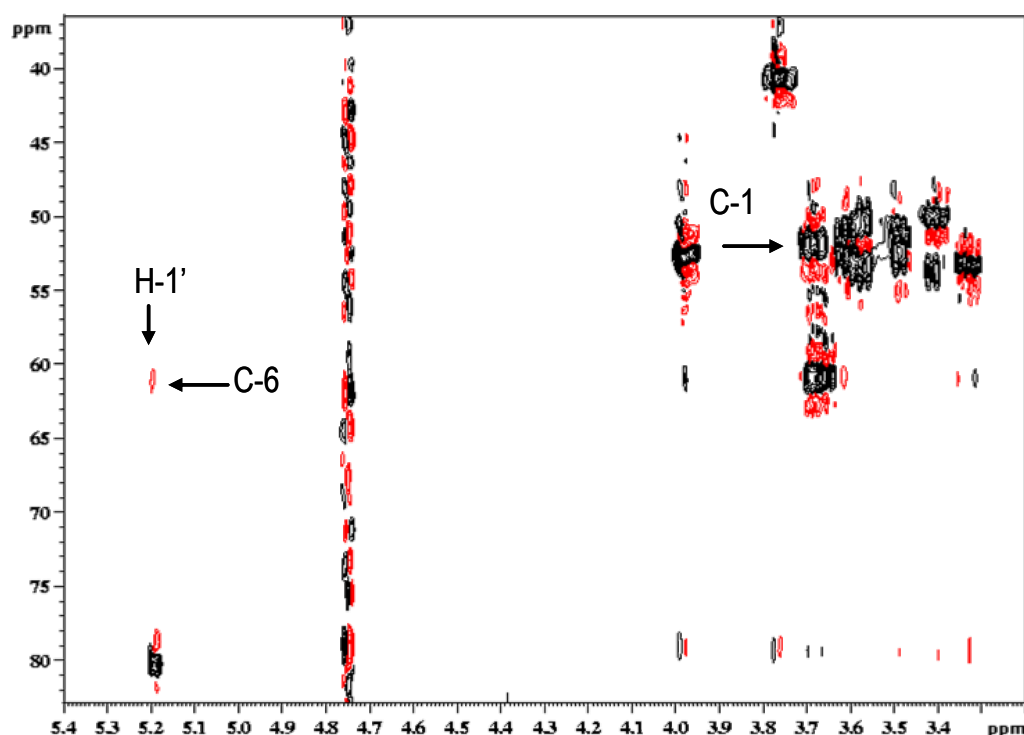


Figura 2.4. Secciones del espectro 2D-HMQC-NOESY (tiempo de mezcla 400 ms) a 500 MHz, 298 K, para **9**.

Para cuantificar las distancias interprotónicas clave se realizaron series de experimentos 1D-NOESY y 1D-ROESY a distintos tiempos de mezcla. Los valores de las constantes de velocidad de relajación cruzada y de las distancias derivadas de éstas se recogieron

en la tabla 2. En el caso de **9** no fue posible el cálculo preciso de todas las distancias interprotónicas debido al solapamiento espectral. Las distancias experimentales se compararon con las estimadas a partir de los cálculos de mecánica molecular (tabla 2) con el fin de comprobar la calidad de estos. Estas distancias teóricas se calcularon como el promedio $\langle r^{-6} \rangle$ de las distancias de todos los conformeros empleados para la construcción de los correspondientes mapas adiabáticos ponderadas en la probabilidad de cada conformero (*véase parte experimental*). Tanto en el caso de **9** como de **10**, se observa una ligera desviación sistemática de las distancias teóricas respecto a las experimentales. Esta discrepancia tiene su origen en una subestimación de la población del mínimo *anti-Ψ* que produce una sobreestima las distancias características de la estructura *syn*, H1'-H1 y H1'-H5. Estos resultados no mejoraron en nuestras manos a pesar de repetir los cálculos empleando otros campos de fuerza u otros tratamientos electrostáticos.

Tabla 2. Constantes de velocidad de relajación cruzada σ y distancias interprotónicas experimentales calculadas para **9** y **10** en D₂O y a 25° C.

	Pareja de Protones	NOESY		ROESY		Teórica d (Å)
		σ s ⁻¹	d (Å)	σ s ⁻¹	d (Å)	
9	H1'-H2'	0,081		0,093		
	H1'-H6 + H1'-H1	0,112		0,058		
	H1'-H5	0,014	3,41	0,009	3,23	3,72
10	H1'-H2'	0,074		0,078		
	H1'-H5	0,018	3,00	0,076	2,38	4,51
	H1'-H6	0,077	2,35	0,189	2,05	2,28
	H1'-H1	0,011	3,24	0,010	3,35	3,86

Esta desviación en la estimación de las poblaciones relativas de los dos conformeros está en aparente contradicción con trabajos previos sobre **1** y **2** en los que se predice una población apreciable del mínimo *anti-Ψ* en **1**.² Esta divergencia puede ser atribuida al empleo de otra forma del campo de fuerzas AMBER según su implementación en DISCOVER³³. Además debido a que en los dos estudios se emplearon técnicas de diferente sensibilidad (2D-NOESY o 1D-NOESY) para la obtención los datos experimentales, no es posible valorar si esta aparente discrepancia en los resultados teóricos refleja o no una realidad demostrable.

El estudio del Prof. Jiménez-Barbero, atribuye un papel conformacional clave a la interacción electrostática de los grupos amonio y fosfato.² Estos grupos se encuentran próximos en el espacio en el mínimo *syn-Ψ* en el compuesto **2** estabilizándolo respecto a la posibilidad tipo *anti-Ψ* que no fue detectado. Por el contrario, en el caso de **1** el fosfato cíclico no es capaz de producir esta estabilización y se observan las dos conformaciones *syn* y *anti-Ψ* en equilibrio.

En nuestro caso, el comportamiento de **9**, que carece de grupo fosfato y por tanto no puede establecer interacciones con el grupo amonio, es similar a **10**, lo que confirmaría esta explicación. Por otro lado, se podría esperar que en el caso de **10** la configuración opuesta del ciclitol pudiera dar lugar a una estabilización electrostática de la forma *anti*. Sin embargo, el estudio de los modelos moleculares correspondientes a los dos mínimos calculados para esta serie revela, que la distancia entre los grupos cargados no es la adecuada para ello. El establecimiento de interacciones electrostáticas implicaría una importante desviación de los valores Φ/Ψ del mínimo. El que no se aprecie una gran modificación de las proporciones de las dos especies, vendría a señalar que esta interacción electrostática no es capaz por sí sola, de dirigir la conformación alrededor del enlace glicosídico. Serían los efectos estereoelectrónicos característicos de carbohidratos (efecto gauche y exo-anomérico) los principales responsables de su geometría, que la interacción electrostática modularía en un cierto grado.

El solapamiento impide la cuantificación del NOE exclusivo de la conformación *syn* en el caso de **7**. Por ello, para comparar las poblaciones relativas de **9** y **10** es necesario analizar las proporciones del NOE exclusivo del conformero minoritario H1'-H5 entre ambos compuestos. Para ello se ha empleado el cociente con una distancia fija, $\sigma_{\text{H1}'\text{-H2}'} / \sigma_{\text{H1}'\text{-H5}}$, (tabla 3) que indica que la proporción de la conformación minoritaria es mayor para el compuesto con fosfato cíclico

Tabla 3. Proporción de NOE para **9** y **10**, obtenidas a partir de los datos de σ^{NOE} procedentes de la tabla 4.

	9	10
$\sigma_{\text{H1}'\text{-H2}'} / \sigma_{\text{H1}'\text{-H5}}$	5,8	4,0

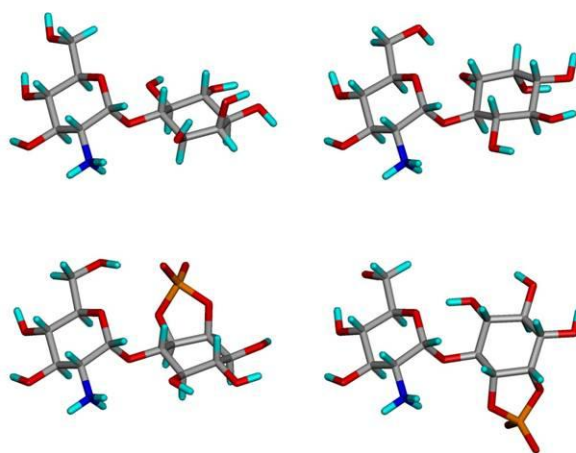
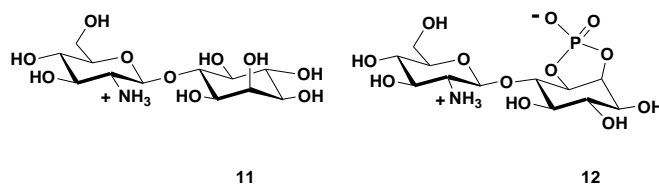


Figura 2.5. Estructuras de mínima energía para **9** (superior) y **10** (inferior), en sus conformaciones *syn-Ψ* (izda) y *anti-Ψ* (derecha).

El análisis de las estructuras de mínima energía de los dos conformeros *syn-Ψ* y *anti-Ψ* entre **9** y **10** (Figura 2.5), sugiere la presencia de interacciones estabilizantes en **10** debidas al grupo fosfato cíclico. Por un lado, el grupo fosfato de **10** podría permitir establecerse un enlace de hidrógeno entre uno de sus oxígenos y el grupo hidroxilo en posición 6 del residuo de glucosamina que estabilizaría la estructura *syn-Ψ* respecto a **9**. Por otro lado la interacción electrostática amonio fosfato lo haría para la estructura *anti-Ψ*. El predominio de la segunda interacción explicaría el aumento de la población del mínimo *anti-Ψ* en **10** con respecto a **9**.

2.3.2.- Motivo estructural glucosamina β (1-6) *mio*-inositol.



Los espectros de RMN han sido asignados como se ha indicado en el apartado anterior. Sus espectros, tanto de ^1H como de ^{13}C son característicos de un enlace glicosídico β con desplazamientos a campo alto de las señales y acoplamientos $J_{\text{H1-H2}} \sim 8\text{Hz}$.

Tabla 4. Desplazamientos químicos de ^1H (δ (ppm)) y ^{13}C (δ (ppm)) y constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ (Hz), en D_2O , de los compuestos **11** y **12** a 25°C y a 500 MHz.

	11		12		11	12
	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$	δ (^{13}C)	δ (^{13}C)
Glucosamina						
H-1	4,63	8,3	4,91	8,4	C-1	106,1
H-2	2,67	8,9	2,96	10,3/10,3	C-2	58,9
H-3	3,92	9,1	3,61	8,9/9,1	C-3	77,9
H-4	3,36	9,9	3,44	9,6/9,9	C-4	71,7
H-5	3,45	2,2/6,0/11,7	3,51	2,9/2,2	C-5	78,4
H6a/H6b	3,89	2,0 12,3	3,73	5,5/5,4	C-6	62,8
	3,70	6,1/12,3	3,90	12,5/12,5		60,7
Ciclitol						
H-1	3,59	2,8/9,9	3,75	5,3	C-1	71,9
H-2	4,05	2,8	4,17	4,2/4,7	C-2	74,1
H-3	3,50	2,8	4,56	8,3/8,3	C-3	73,2
H-4	3,62	9,6	4,06	10,3/9,2	C-4	74,6
H-5	3,44	9,4	3,40	9,9/9,9	C-5	76,1
H-6	3,79	9,6	3,68	9,7	C-6	84,6

En este caso para el cálculo de los correspondientes mapas adiabáticos y de distribución de poblaciones (Figura 2.6) se consideraron un total de 12 mapas relajados en el

caso de **11** y 36 para **12**, lo cual supuso un total de 7200 y 2400 conformeros estudiados respectivamente.

Tal y como cabe esperar para estructuras con enlaces glicosídicos de tipo β , se observan tres mínimos locales en los mapas relajados, los ya conocidos *syn*- Ψ , *anti*- Ψ , y aparece el denominado mínimo *anti*- Φ (valores de Φ en 180°). Entre estas, como cabía esperar la conformación *syn*- Ψ es la energéticamente favorecida. Los NOE exclusivos que caracterizarían estos mínimos son el H1'-H6 acompañado por contactos débiles H1'-H1 para el *syn*- Ψ ; H1'-H1 y H1'-H5 para la orientación *anti*- Ψ , mientras que H2'-H6 sería el NOE exclusivo para la conformación *anti*- Φ .

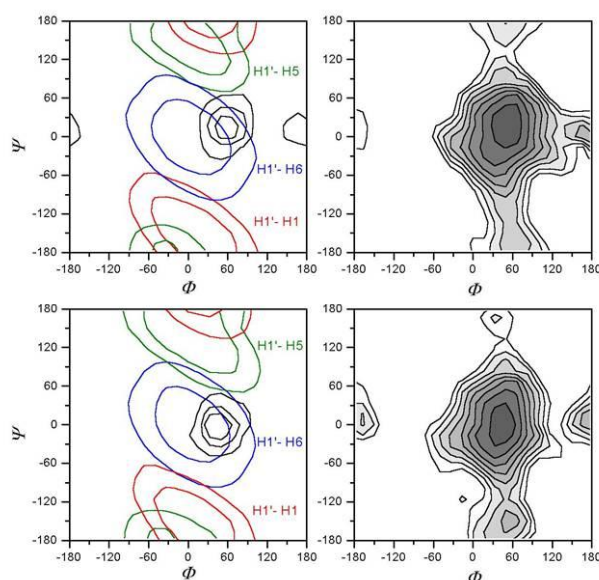


Figura 2.6. Mapas de energía adiabáticos calculados para el compuesto **11** (superior derecha) y **12** (inferior derecha) y superposición de los NOEs predichos en los mapas de distribución de probabilidad conformacional (superior izda para **11** e inferior izda para **12**). Los niveles de contornos se muestran cada 5KJ mol^{-1} para la energía, las distancias interprotónicas a 2,5 y 3 Å y los de probabilidad a 10, 5,5 y 1% para ambos compuestos.

El espectro NOESY de **11** mostró picos de cruce intensos entre H1'-H6 y débiles para H1'-H1 (Figura 2.7) indicando el predominio de estructuras de tipo *syn*- Ψ . Desafortunadamente el contacto exclusivo de la conformación *anti*- Ψ (H1'-H5), no puede ser cuantificado directamente debido al solapamiento con el NOE intra-residuo H1'-H5'. Dado que tanto H3' como H5' se encuentran a una distancia equivalente de H1' y experimentan similares movimientos internos la comparación entre las intensidades de los picos H1'-H3' y la suma de

H1'-H5' y H1'-H5 permitieron deducir una contribución apreciable del NOE H1'-H5. En el compuesto **12**, se puede observar directamente la presencia de un NOE intenso correspondiente a H1'-H6 junto con otros dos débiles para H1'-H5 y H1'-H1. Estos resultados junto con la dependencia de las distancias interprotónicas con la conformación del enlace glicosídico (Figura 2.7) indican que ambos compuestos se encuentran en un equilibrio entre los conformeros anti- Ψ y syn- Ψ con una mayor contribución de la forma syn- Ψ .

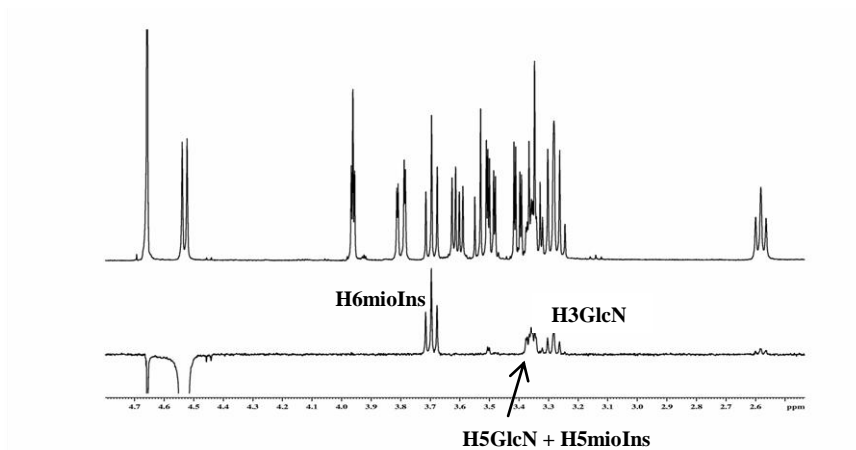
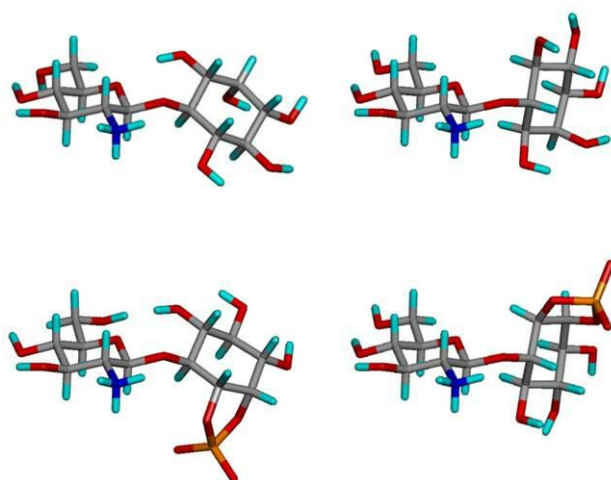


Figura 2.7 Espectro de ^1H -RMN (superior) y 1D-dpfgse-NOESY (inferior) del compuesto **11**, en D_2O , a 500 MHz. Se muestran los NOEs inter- e intra-residuo que caracterizan las conformaciones anti- Ψ y syn- Ψ predichas en los cálculos.

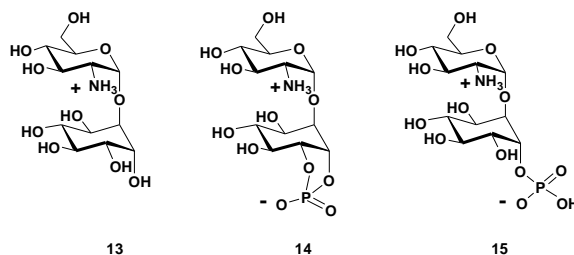
El análisis cuantitativo de las distancias experimentales (tabla 5) indicó que existen pequeñas diferencias entre los comportamientos de ambos compuestos, que son compatibles con un ligero aumento de la conformación syn- Ψ de **12** con respecto a la de **11**. Por un lado, la distancia experimental H1'-H1 para **11** es más corta y por otro la proporción de σNOE entre los NOEs exclusivos de los mínimos syn- Ψ y anti- Ψ es mayor para **12** (H1'-H6 / H1'-H1 es 5,8 para **11** y 6,8 para **12**). El análisis de las estructuras relajadas correspondiente a ambas situaciones (Figura 2.8) sugiere que la principal razón estructural para esta diferencia podría ser una interacción electrostática amonio-fosfato, sólo posible en la conformación syn- Ψ favorable en **12**.

Tabla 5. Constantes de velocidad de relajación cruzada σ y distancias interprotónicas experimentales calculadas para **11** y **12** en D₂O y 25°C.

	Par de Protones	NOESY		ROESY		Teórica d [Å]
		σ [s ⁻¹]	d [Å]	σ s ⁻¹	d [Å]	
11	H1'-H2'	0,018		0,019		
	H1'-H3'	0,063		0,190		
	H1'-H5' + H1'-H5	0,104		0,170		
	H1'-H6	0,128	2,21	0,261	2,35	2,30
	H1'-H1	0,022	2,97	0,047	3,13	4,49
12	H1'-H2'	0,005		0,027		
	H1'-H3'	0,051		0,130		
	H1'-H5'	0,108		0,256		
	H1'-H6	0,103	2,41	0,257	2,39	2,28
	H1'-H1	0,015	3,33	0,024	3,56	4,04
	H1'-H5	0,017	3,27	0,027	3,49	4,53

**Figura 2.8.** Estructuras más estables de **11** (superior) y **12** (inferior), en sus conformaciones *syn-Ψ* (izda) y *anti-Ψ* (derecha).

2.3.3.- Motivo estructural glucosamina α (1-6) *quiro*-inositol.



Los compuestos **13**, **14** y **15** han sido analizados empleando la misma metodología que la descrita para los derivados de *mio*-inositol estudiados hasta ahora. Estructuralmente, el cambio de *mio* por *quiro* supone en primer lugar variar la disposición del oxígeno glicosídico respecto al anillo de ciclitol y en segundo la estereoquímica de otros sustituyentes. Los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de estos compuestos se muestran en la tabla 6. Como cabe esperar, los anillos de glucosamina y *quiro*-inositol de los tres compuestos tienen un comportamiento monoconformacional y la silla del anillo de ciclitol de **14** se distorsiona por efecto del ciclo de 5 miembros (ver las $^3J_{H2-H3}$ y $^3J_{H1-H2}$).

Tabla 6. Desplazamientos químicos de 1H (δ (ppm)) y ^{13}C (δ (ppm)) y constantes de acoplamiento $^3J_{H-H}$ (Hz), en D_2O , de los compuestos **13**, **14** y **15** a 25°C y a 500 MHz.

	13		14		15	
	δ (1H)	$^3J_{H-H}$	δ (1H)	$^3J_{H-H}$	δ (1H)	$^3J_{H-H}$
Glucosamina						
H-1	5,00	3,6	5,22	3,1	5,14	3,7
H-2	2,79	10,2/3,2	3,07	8,2	2,91	10,5
H-3	3,61	9,7	3,74	9,3	3,68	9,5
H-4	3,40	9,6	3,48	9,7	3,44	9,5
H-5	3,97	2,5/10,1/4,5	4,01	2,6/4,5/12,5	4,01	2,6/4,6/10,2
H6a/H6b	3,75	4,6	3,81	4,4	3,80	2,4
	3,80	12,4	3,81	12,5/2,7	3,77	12,5/4,6
Ciclitol						
H-1	4,01	3,6	4,67	5,0	4,47	2,1/ 4,0/8,7
H-2	3,82	3,7/9,6	4,45	8,6/5,6	3,65	10,4
H-3	3,59	8,9	3,82	8,9	3,67	8,7
H-4	3,55	9,2	3,70	8,7	3,56	9,7
H-5	3,70	3,4/9,5	3,91	3,2/8,1	3,95	10,1/3,4
H-6	4,12	3,6	4,30	3,7	4,18	3,8

Los mapas adiabáticos calculados para los compuestos **13**, **14** y **15**, con uniones α y D-*quiro*-inositol, predicen un único mínimo poblado de tipo *syn*- Ψ (Figura 2.9 y 2.10). Un análisis más detallado de los mapas adiabáticos y de probabilidad hizo evidentes pequeños desplazamientos del mínimo global desde Φ -27,0 / Ψ 41,8 para **13** hasta Φ -42,4 / Ψ 4,7 para el compuesto **15**. El compuesto **14** muestra una combinación de ambas situaciones con dos puntos estables de similar probabilidad a Φ -27,2 / Ψ 40,2 y Φ 48,3 / Ψ 22,9. Para la siguiente discusión estos dos tipos de submínimos en **13**, **14** y **15** se denominaron: A1 el de alrededor de Φ 30 Ψ 30 y A2 el próximo a Φ -40 Ψ 10. Las minimizaciones de los rotámeros de baja energía obtenidos a partir de los mapas relajados de energía convergen exclusivamente en mínimos de tipo A1 para **13**, y de tipo A2 para **15**, mientras que **14** alcanza ambos dependiendo de la estructura de partida (Figura 2.10).

Los NOE clave que caracterizan el mínimo global *syn*- Ψ son H1'-H6 y H1'-H1 que en estos casos intersectan el área de mayor población del espacio conformacional. Un hipotético mínimo *anti*- Ψ , improbable según los cálculos de mecánica molecular, sería detectado por la observación de los NOEs exclusivos H1'-H2 y/o H1'-H4. Los resultados experimentales ratificaron las predicciones hechas por la mecánica molecular, ya que se observan intensos NOE entre H1'-H6 y H1'-H1 y no se detectan, los NOEs exclusivos de una conformación *anti*- Ψ .

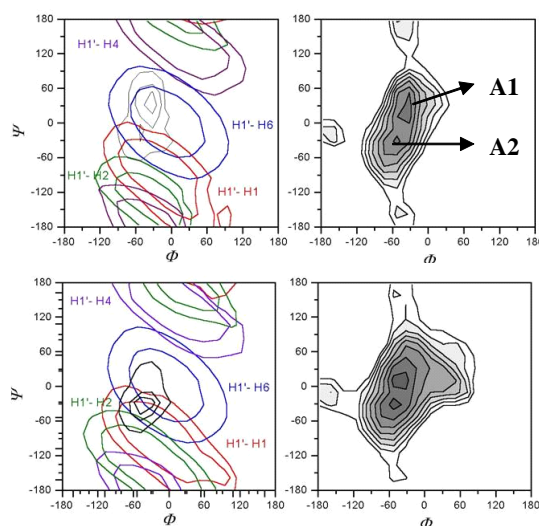


Figura 2.9. Mapas de energía adiabáticos calculados para el compuesto **13** (superior derecha) y **15** (inferior derecha) y superposición de los NOEs predichos en los mapas de distribución de probabilidad conformacional (superior izda para **13** e inferior izda para **15**). Los niveles de contornos se muestran cada 5KJ mol⁻¹ para la energía, las distancias interprotónicas a 2,5 y 3 Å y los de probabilidad a 10, 5.5 y 1% para ambos compuestos. Se muestran los 2 submínimos A1 y A2 del mínimo *syn*- Ψ .

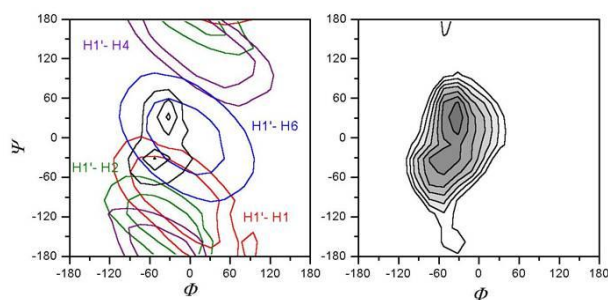


Figura 2.10 Mapa de energía adiábatico (derecha) calculado para el compuesto **14** y superposición de los NOEs predichos en el mapa de distribución de probabilidad conformacional (izquierda). Los niveles de contornos se muestran cada 5 KJmol^{-1} para la energía, las distancias interprotónicas a 2,5 y 3 Å y los de probabilidad a 10, 5.5 y 1%.

Las distancias experimentales (tabla 7) calculadas a partir de σ^{NOE} , están en acuerdo con las calculadas a partir de los mapas adiabáticos como promedio $\langle r^{-6} \rangle$, sobre todo el espacio conformacional. Es interesante destacar que tal concordancia se pierde al considerar las mismas distancias en el conformero de mínima energía donde se aprecia una considerable desviación en el caso de H1'-H1. Esta observación indicó que aunque **13**, **14** y **15** presenten un claro comportamiento monoconformacional tienen aún una elevada flexibilidad dentro de este mínimo como, por otro lado, indica su considerable anchura en los mapas adiabáticos.

Tabla 7. Constantes de velocidad de relajación cruzada σ , y distancias interprotónicas experimentales para **13**, **14** y **15** calculadas en D_2O y a 25°C . Las distancias teóricas están calculadas sobre mapas adiabáticos.

	Par Protones	$\sigma [\text{s}^{-1}]$	Exp. d [Å]	Teórica d [Å]	Teórica $\langle r^{-6} \rangle$ d [Å]
13	H1'-H2'	0,094			
	H1'-H6	0,100	2,37	2,25	2,4
	H1'-H1	0,081	2,46	4,06	2,6
14	H1'-H2'	0,123			
	H1'-H6	0,138	2,35	2,25	2,39
	H1'-H1	0,111	2,44	3,97	2,52
15	H1'-H2'	0,090			
	H1'-H6	0,104	2,33	2,21	2,70
	H1'-H1	0,095	2,37	3,19	2,32

Un análisis cuantitativo de las velocidades de relajación cruzada, σ^{NOE} , permitió realizar un estudio comparativo de **13**, **14** y **15**. Si bien toda la región *syn*- Ψ poblada por este tipo de mínimo coincide con la zona que define los NOEs H1'-H6 y H1'-H1, la distribución de estas distancias no es simétrica respecto a los submínimos A1 y A2. La distancia H1'-H1 resulta más corta para el submínimo A2 que para A1 y viceversa para H1'-H6. Por lo tanto, el cociente entre σ^{NOE} de H1'-H6 y H1'-H1 puede ser un elemento de diagnóstico que indicaría si

la población dentro del mínimo global A está desplazada hacia el sur, mínimo A1, ó hacia el norte, mínimo A2. Así **13**, para el que se predice un mayor peso para el mínimo local A1, posee la mayor proporción $H1'-H1/H1'-H2'$ (1,2). El compuesto **15** posee la menor proporción (0,9), correspondiendo con una mayor población A2. Finalmente, **14** para el que se predice un comportamiento mixto, exhibe un valor intermedio para este cociente. Otros picos NOE detectados, también se corresponden con esta descripción; así los contactos débiles entre $H5'-H4$ y $H5'-H6$ podrían ser considerados NOEs exclusivos de los submínimos A1 y A2 respectivamente. Mientras que el compuesto **13** posee un pico de cruce de tipo medio entre $H5'$ y $H4$ pero no con $H6$, lo que se corresponde con una situación más próxima al submínimo A1, **14** y **15** muestran el efecto contrario y se observa el NOE $H5'-H6$ pero no el $H5'-H4$.

Esta diferencia de comportamiento podría reflejar la existencia de diferentes tipos de interacciones asociadas a la presencia del grupo fosfato en el residuo de *quiro*-inositol. Las estructuras relajadas del tipo A1 presentan una red de enlaces de hidrógeno (entre 4-HO-Ins y 6-O-Glc; 5-HO-Ins y 6-O-Glc y entre 5-HO-Ins y 5-O-Glc) que resulta imposible en una conformación de tipo A2 (Figura 2.11). Por otro lado, la distancia entre los grupos amonio y fosfato es menor en las estructuras de tipo A2 que en las A1 y la energía de interacción electrostática es más estabilizante para el fosfato libre que para el cíclico debido a que se encuentra restringido quedando mas alejado de la carga positiva.

Si se consideran estos efectos estabilizantes opuestos actuando conjuntamente se puede proponer una explicación para las preferencias conformacionales de **13**, **14** y **15**. La red de enlaces de hidrógeno descrita en la figura 2.12 estaría presente en todos los compuestos estabilizando una estructura tipo A1 como ocurre en **13** donde no operan otros efectos. La interacción electrostática debida al grupo fosfato estabilizaría la forma A2 compensando la pérdida de la red de enlaces de hidrógeno. Cuando esta interacción electrostática es mayor, como en el caso del grupo fosfato libre presente en **15**, sólo se observaría el mínimo A2 mientras que en el caso de **14** esta interacción no es suficiente y se observaría una situación intermedia.

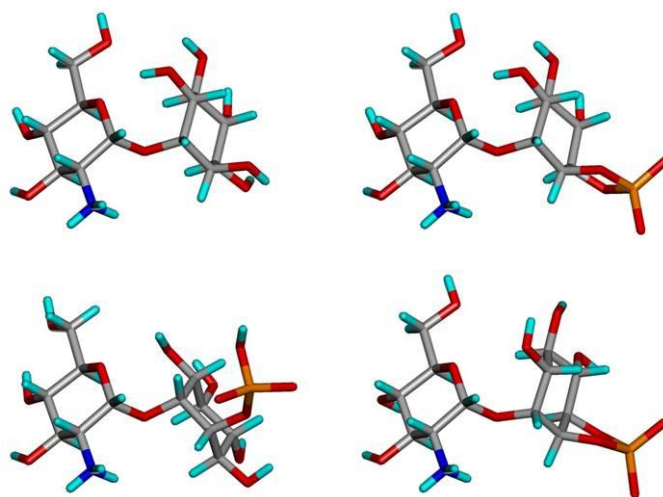


Figura 2.11. Estructuras minimizadas para el motivo estructural α (1-6) quiro-inositol, submínimo A1(arriba) para el compuesto **13** (izquierda) y **14** (derecha) y submínimo A2 (abajo) para los compuestos **15** (izquierda) y **14** (derecha).

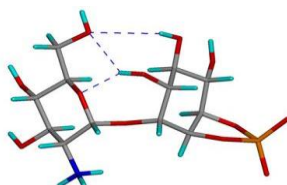
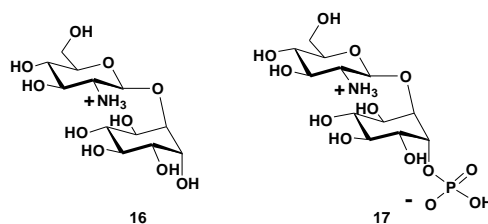


Figura 2.12. Red de enlaces de hidrógeno que muestra el compuesto **14** únicamente a través del submínimo de tipo A1.

2.3.4.- Motivo estructural glucosamina β (1-6) *quiro*-inositol.



Los compuestos **16** y **17**, son los representantes del patrón estructural β (1 \rightarrow 6) *quiro*-inositol. Los espectros de ^1H -RMN de ambos fueron asignados (tabla 8), aunque en este caso la escasa cantidad de material disponible impidió el registro y asignación de los espectros de ^{13}C . Como se observó para los derivados α (1 \rightarrow 6) *quiro*-inositol, las constantes de acoplamiento indican que los anillos de los residuos de glucosamina y ciclitol tienen un comportamiento monoconformacional.

Tabla 8. Desplazamientos químicos de ^1H (δ (ppm)) y ^{13}C (δ (ppm)) y constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ (Hz), en D_2O , de los compuestos **16** y **17** a 25°C y a 500 MHz.

	16		17	
	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$
Glucosamina				
H-1	4,57	8,2	4,66	8,2
H-2	2,71	9,9	2,77	8,7/10,3
H-3	3,41	9,5	3,45	9,4
H-4	3,37	9,3	3,36	9,4
H-5	3,47	2,3/9,3	3,47	2,2/ 5,5/9,9
H6a/H6b	3,74	2,3/12,3/5,6	3,90	2,2/12,7/5,7
	3,92	10,7	3,71	10,4
Ciclitol				
H-1	4,26	3,6	4,58	3,0/4,2/8,5
H-2	3,77	3,2/9,5	3,68	2,6/9,8
H-3	3,57	9,4	3,62	8,8
H-4	3,62	9,5	3,54	9,4
H-5	3,84	3,3/ 9,7	3,93	10,0
H-6	4,06	3,7	4,19	3,8

Las superficies de energía y mapas de probabilidad globales de los derivados de β -*quiro*-inositol **16** y **17** calculadas siguiendo el mismo protocolo empleado con resto de compuestos presentan un único mínimo syn- Ψ a Φ 56 ± 5 , Ψ 17 (Figura 2.13). Esta predicción se encuentra de acuerdo con el efecto exo-anomérico para una disposición β para la unión glicosídica. En estos mapas se aprecia claramente que aunque la posición del mínimo global es muy similar en ambos casos, la región accesible del derivado con fosfato **17** está mucho más restringida que para **16**. Al igual que en el caso de los anómeros α de la serie *quiro* en los

mapas Φ/Ψ se aprecia una considerable disminución de la flexibilidad con respecto a análogos en la serie *mio*-inositol.

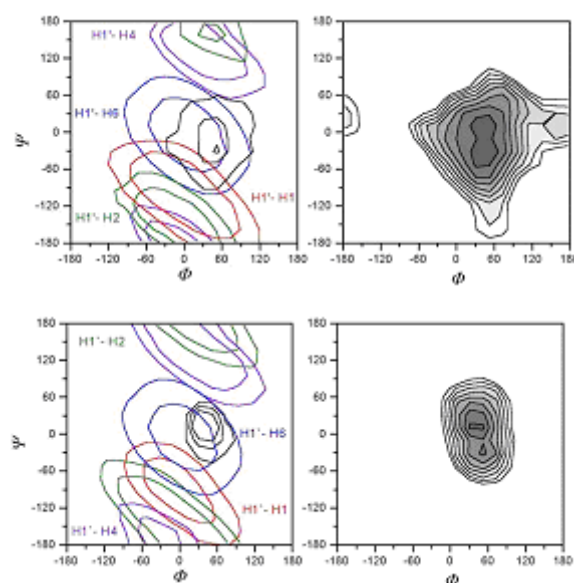


Figura 2.13. Mapas de energía adiabáticos calculados para el compuesto **16** (superior derecha) y **17** (inferior derecha) y superposición de los NOEs predichos en los mapas de distribución de probabilidad conformacional (superior izda para **16** e inferior izda para **17**). Los niveles de contornos se muestran cada 5KJ mol^{-1} para la energía, las distancias interprotónicas a 2,5 y 3 Å y los de probabilidad a 10, 5.5 y 1% para ambos compuestos.

Experimentalmente se detectan dos NOEs glicosídicos intensos: H1'-H6 y H1'-H1, este último con menor intensidad. De acuerdo con los mapas de distancias interprotónicas Φ,Ψ (Figura 2.13) estos corresponden a los NOEs exclusivos de la única conformación predicha por los cálculos. No se encuentra, incluso a tiempos de mezcla largos, ninguna evidencia de otros NOEs interglicosídicos como H1'-H4 ó H1'-H2, que serían representativos de una hipotética situación *anti*- Ψ . Los resultados experimentales confirman cualitativamente las predicciones teóricas, definiendo el enlace glicosídico de **16** y **17** como un único mínimo de tipo *syn*- Ψ .

A partir de las constantes de relajación cruzada (tabla 9) se calcularon las distancias experimentales para **17**. Desafortunadamente esto no fue posible para **16** debido a la ausencia de un valor fiable para la constante σ_{NOE} de una distancia de referencia porque H1'-H3' y H1'-H5' están solapadas y H1'-H2', contaminado por acoplamiento escalar. Tampoco se puede considerar como referencia el promedio de distancias H1'-H3' y H1'-H5', puesto que debido a

un acoplamiento escalar fuerte de H3' con H4' se produce una pérdida de NOE de H3' a H4' por esta vía indirecta. A pesar de no poder disponer de distancias experimentales fiables la similitud de los valores de σ^{NOE} para H1'-H6 y H1'-H1, entre los compuestos **16** y **17** permite suponer un gran parecido de su estructura en disolución. Para **17** al igual que ocurrió con el motivo β *mio*- se observa una buena concordancia entre los resultados experimentales y la predicción, que es mejor en el caso de las distancias calculadas sobre el espacio Φ, Ψ completo que sobre las estructuras relajadas. Esta observación es indicativa de la flexibilidad del enlace glicosídico dentro de este mínimo como predice el mapa adiabático (Figura 2.13). En este compuesto aparece también un pico de cruce H1'-H4' originado por fuerte acoplamiento entre H3'-H4'.

Tabla 9. Constantes de velocidad de relajación cruzada σ , y distancias interprotónicas experimentales para **16** y **17** calculadas en D₂O y a 25°C. Las distancias teóricas están calculadas sobre de mapas adiabáticos.

	Par Protones	σ [s ⁻¹]	Exp. d [Å]	Teórica d [Å]	Teórica < r ⁶ > d [Å]
16	H1'-H3' + H1'-H5' (referencia solapada)	0,117			
	H1'-H4'	0,060			
	H1'-H6	0,156		2,30	2,30
	H1'-H1	0,029		3,77	3,43
	H1'-H2'	0,023			
17	H1'-H3' (referencia)	0,121			
	H1'-H5' (referencia)	0,134			
	H1'-H6	0,121	2,49	2,36	2,28
	H1'-H1	0,023	3,29	3,87	3,47
	H1'-H2'				

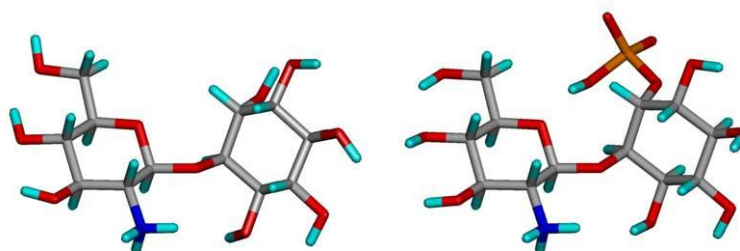
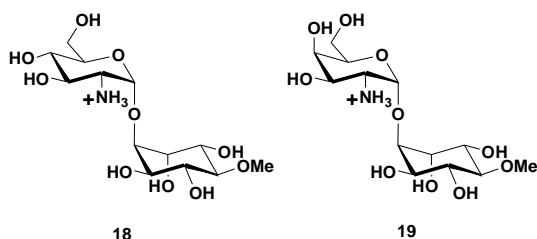


Figura 2.14. Estructuras de mínima energía para los compuestos **16** (izda) y **17** (derecha).

Cuando se compararon las estructuras relajadas de **16** y **17**, representadas en la figura 2.14, se pudo apreciar un enlace de hidrógeno estabilizante entre protón del fosfato y el oxígeno del anillo de piranosa O-5 Glc, en **17**. Esta interacción inter-residuo, ausente en **16**,

podría explicar la menor dispersión del mínimo *syn-Ψ* para **17** que reflejan los cálculos teóricos.

2.3.5.- Motivo estructural hexosamina α (1→6) Pinitol



Las razones por las que se diseñaron y sintetizaron los compuestos **18** a **21**, se alejan en cierto modo de la búsqueda sistemática en la que se basaron los modelos de IPGs de tipo A y de tipo P. Como consecuencia de este cambio aparecieron dos nuevos componentes, los residuos de pinitol y de galactosamina. Aunque ambos implican nuevas características estructurales a la hora de la interacción con potenciales receptores, no deberían suponer una gran alteración de la geometría del enlace glicosídico, puesto que las diferencias con inositol y glucosamina están alejadas de él. Por ello, es especialmente interesante determinar si estos cambios no alteran en esencia la geometría del esqueleto común con respecto a los derivados de *quiro*-inositol **13** a **17**. De ser así, mediante la comparación de las actividades biológicas, se podría deducir la importancia relativa de los grupos en posición 4 de la hexosamina y del pinitol en su función como IPGs. Coincidiendo con esta modificación, también se decidió ampliar los cálculos teóricos incluyendo simulaciones de dinámica molecular para complementar los mapas adiabáticos ya que estas consideran más adecuadamente la flexibilidad de los pseudodisacáridos.

Empleando la metodología habitual fue posible realizar asignación inambigua de los compuestos **18** y **19** (tabla 10). Los anillos de piranosa y pinitol adoptaron la esperada conformación 4C_1 como indican los valores de las constantes de acoplamiento.

Tabla 10. Desplazamientos químicos de 1H (δ (ppm)) y ${}^{13}C$ (δ (ppm)) y constantes de acoplamiento ${}^3J_{H-H}$ (Hz), en D_2O , de los compuestos **18** y **19** a 25°C y a 500 MHz.

	18		19	
	δ (1H)	${}^3J_{H-H}$	δ (1H)	${}^3J_{H-H}$
Hexosamina				
H-1	5,07	3,5	5,31	3,85
H-2	2,97	-	3,54	11,2
H-3	3,70	9,4	4,11	3,3
H-4	3,43	10,4	4,02	2,0
H-5	3,99	4,2	4,26	6,5
H6a/H6b	3,77	2,7	3,74	2,5
	3,77	-	3,74	-
Ciclitol				
H-1	4,12	3,5	4,16	3,4
H-2	3,74	10,1	3,74	10,0
H-3	3,31	9,4	3,34	9,3
H-4	3,65	10,4	3,68	10,5
H-5	3,85	3,7	3,89	3,5
H-6	4,02	3,8	4,11	3,8

El análisis conformacional de **18** y **19** mediante las superficies de energía adiabáticas de los ángulos de torsión glicosídicos empleando AMBER* y el modelo GB/SA predice, para ambos compuestos, un único mínimo del tipo *sin*- Ψ con población detectable (Figuras 2.15).

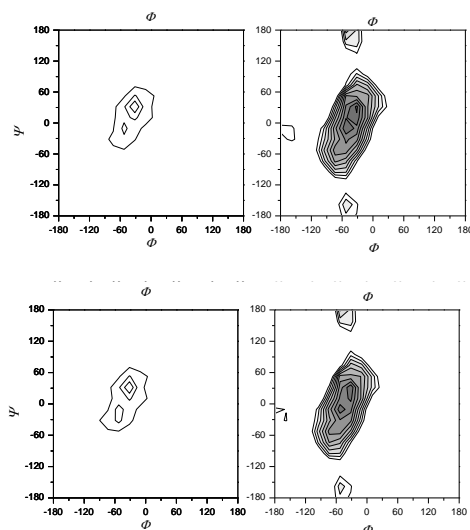


Figura 2.15. Mapa de energía adiabático (derecha) y mapa de distribución de probabilidad (izquierda), calculados para **18** (arriba) y para **19** (abajo).

El comportamiento de ambos compuestos es similar al de los derivados de *quiro*-inositol con enlaces α **13-15**; se distinguen dos submínimos locales en los mapas adiabáticos de **18** y **19**. Por lo tanto parece que, como cabía esperar, la inclusión del grupo metoxilo en el anillo de inositol no afecta apreciablemente a la disposición adoptada por los enlaces glicosídicos. La semejanza entre los mapas de **18** y **19** también indicó que la estereoquímica de la posición 4 de la hexosamina no altera el comportamiento del enlace glicosídico, conclusión que por las mismas razones también era presumible.

Los potenciales NOE exclusivos deducidos de los mapas de distancias interprotónicas son similares a los de los compuestos análogos **13-15**: H1'-H6 para la conformación *syn*- Ψ , y H1'-H5, para la *anti*- Ψ . El NOE H1'-H1 intersecta con ambas regiones y por lo tanto no se puede emplear con carácter de diagnóstico. Experimentalmente se observaron para **18** y **19** los NOEs entre H1'-H6 y H1'-H1, mientras que en ningún caso se pudo detectar la presencia del NOE H1'-H5. Por lo tanto, cualitativamente se puede concluir que los compuestos con el motivo hexosamina α (1-6) pinitol se presentan en disolución como un único tipo de conformación del tipo *syn*- Ψ .

Simulaciones de dinámica molecular

A lo largo de los estudios anteriores se había observado que al considerar todo el espacio Φ/Ψ para la estimación de distancias teóricas, el ajuste con los datos experimentales mejoraba. Esta observación indica que estos compuestos poseen una flexibilidad apreciable, incluso aquellos considerados como semirígidos, tal y como corresponde a su naturaleza glucídica. Por esta razón se decidió ampliar el estudio teórico incluyendo simulaciones de dinámica molecular para mejorar la descripción de la flexibilidad. En el momento de comenzar este estudio no había antecedentes en el empleo en simulaciones de dinámica molecular de la modificación de Senderowitz et al. al campo de fuerzas AMBER, que había sido seleccionada por sus mejores resultados en las simulaciones de mecánica molecular. Por esta razón se decidió realizar otro estudio comparativo de sus resultados en simulaciones de dinámica molecular con la alternativa clásica de Homans.

En primer lugar se realizaron dinámicas moleculares de 2 ns de los compuestos **18-21** partiendo de estructuras generadas mediante minimización exhaustiva de los mínimos absolutos determinados a partir de los mapas adiabáticos y empleando condiciones típicas: acoplamiento a baño térmico de 0,1 ps, $\epsilon=80$ y el algoritmo SHAKE⁷¹. Los resultados no fueron en absoluto satisfactorios. Se observó un fuerte amortiguamiento de las oscilaciones de los ángulos de torsión Φ, Ψ al avanzar la simulación (Figura 2.16).

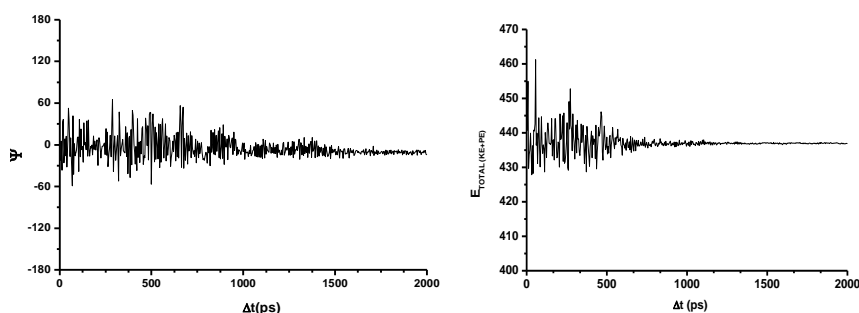


Figura 2.16. Valores del angulo de torsión Ψ y energía total durante simulaciones de dinámica molecular de 2ns con $\epsilon=80$ y a 25°C del **18**.

Se pensó que o bien el acoplamiento al baño térmico era excesivo o que la estructura de partida no era estable. Sin embargo, ni la cuidadosa minimización de la geometría inicial, ni la relajación del acoplamiento al baño térmico (desde 0,1 hasta 5 ps), evitaron el efecto amortiguante, aunque lo disminuyeron. Tampoco se consiguieron simulaciones aceptables ni incluyendo protocolos de equilibración con etapas de calentamiento progresivo (desde 0°C hasta 25°C), ni variando la constante dieléctrica del medio (desde 1 a 80)^{56, 72} para modular el peso de las interacciones electrostáticas. Con el fin mejorar el control sobre el balance energético se emplearon dinámicas estocásticas o de Langevin (SD). Estas incluyen la regulación de la energía cinética en las ecuaciones básicas de la simulación por lo que proporcionan, entre otras innovaciones, una mejora en el comportamiento de la temperatura durante la trayectoria. Las inestabilidades e imperfecciones observados anteriormente se evitaron completamente al emplear la dinámicas estocásticas tal y como se implementan en el programa Macromodel.

Tras establecer las condiciones óptimas de simulación se procedió a calcular las trayectorias durante 5 ns de los derivados **18-19** considerando dos tratamientos electrostáticos ($\epsilon=80$, GB/SA) y dos parametrizaciones (Senderowitz et al/ Homans) diferentes. Los resultados de las simulaciones (Figura 2.17), indicaron la presencia de un único mínimo de tipo syn- Ψ , en la zona central del mapa (Φ , Ψ) no observándose interconversiones hacia regiones de tipo anti- Ψ . Estos resultados, presentan un acuerdo cualitativo con los mapas adiabáticos calculados mediante MM (Figura 2.15). Dados los errores observados en las dinámicas newtonianas se tuvo especial precaución en comprobar que en las nuevas condiciones el sistema era simulado de forma realista. Para ello, se repitieron las simulaciones partiendo de estructuras con diferentes orientaciones del grupo hidroxilo primario (gg, gt y tg) o metilo en posición 3 del residuo de inositol. En todos los casos se comprobó que tras un periodo de equilibración los resultados eran independientes de la estructura de partida. Las trayectorias de los ángulos torsionales Φ y Ψ fueron similares, independientemente de la parametrización empleada y de si el carbohidrato en posición no reductora, era glucosamina o galactosamina. Los valores (Φ , Ψ) promedio obtenidos tras 5 ns de simulación fueron (-41°, -21°) y (-45°, -26°) para **18** y (-42°, -21°) y (-45°, 26°) para **19**, empleando respectivamente los parámetros de Homans y Stille.

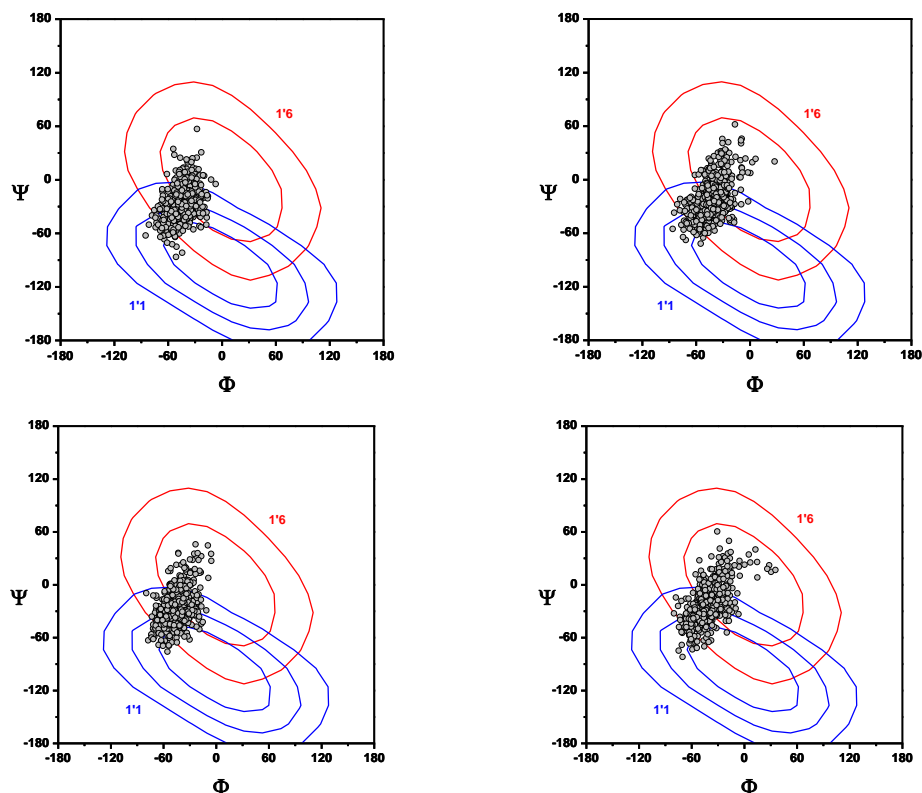


Figura 2.17. Mapas de la distribución de los ángulos de torsión glicosídicos durante simulaciones de 5ns mediante dinámica estocástica, de los compuestos **18** (arriba) y **19** (abajo) empleando las parametrizaciones de Senderowitz et al (izda) y Homans (derecha), junto con la superposición de los NOEs exclusivos para la conformación *syn*- Ψ ($H1'-H6$ y $H1'-H1$).

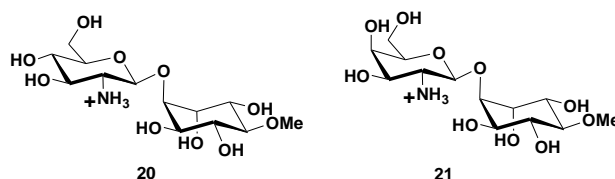
Las distancias interprotónicas experimentales se calcularon a partir de las velocidades de relajación cruzada obtenidas a su vez del análisis de la velocidad de crecimiento de los NOEs. En la tabla 11 se comparan estas distancias con las teóricas calculadas a partir de las estructuras relajadas de mecánica molecular (MM) o de los promedios a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular (MD).

Tabla 11. Distancias clave interprotónicas experimentales y estimadas a partir de cálculos de mecánica y dinámica molecular empleando las parametrizaciones de Senderowitz et al y Homans para los compuestos **18** y **19**.

Par Protones		18	19
H1' – H6	Experimental, RMN	(2,5)	(2,4)
	(MD) Senderowitz $\epsilon=80$	2,5	2,4
	(MD) Senderowitz GB/SA	2,5	2,5
	(MM) Senderowitz GB/SA	2,3	2,3
	(MD) Homans GB/SA	2,4	2,4
	(MM) Homans GB/SA	2,4	2,7
H1' – H1	Experimental, RMN	(2,4)	(2,4)
	(MD) Senderowitz $\epsilon=80$	2,4	2,4
	(MD) Senderowitz GB/SA	2,4	2,4
	(MM) Senderowitz GB/SA	4,0	4,0
	(MD) Homans GB/SA	2,5	2,5
	(MM) Homans GB/SA	3,9	3,5

En general, se puede observar un ajuste bastante bueno entre las distancias experimentales y teóricas, independientemente del campo de fuerzas empleado y condiciones electrostáticas. Este ajuste fue siempre mejor para las simulaciones de dinámica molecular debido a que las estructuras relajadas no consideran la flexibilidad alrededor del mínimo energético.

2.3.6.- Motivo estructural hexosamina β (1 \rightarrow 6) pinitol.



La asignación de los compuestos **20** y **21** también se realiza por la metodología bidimensional habitual, y al igual que **18** y **19** las constantes de acoplamiento indican que todos los residuos se encuentran en la acostumbrada conformación de silla.

Tabla 12. Desplazamientos químicos de ^1H (δ (ppm)) y ^{13}C (δ (ppm)) y constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ (Hz), en D_2O , de los compuestos **18** y **19** a 25°C y a 500 MHz.

	20		21	
	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$
Hexosamina				
H-1	4,52	8,39	4,78	8,53
H-2	2,66	9,6	3,20	11,1
H-3	3,37	-	3,85	3,35
H-4	3,33	9,54	3,91	2,84
H-5	3,42	5,6	3,75	-
H6a/H6b	3,70	2,84	3,76	-
	3,88	12,47	3,80	-
Ciclitol				
H-1	4,21	3,2	4,30	3,3
H-2	3,80	10,2	3,85	10,2
H-3	3,30	9,5	3,35	9,4
H-4	3,65	10,3	3,71	10,2
H-5	3,82	3,5	3,91	3,2
H-6	4,00	4,1	4,09	4,1

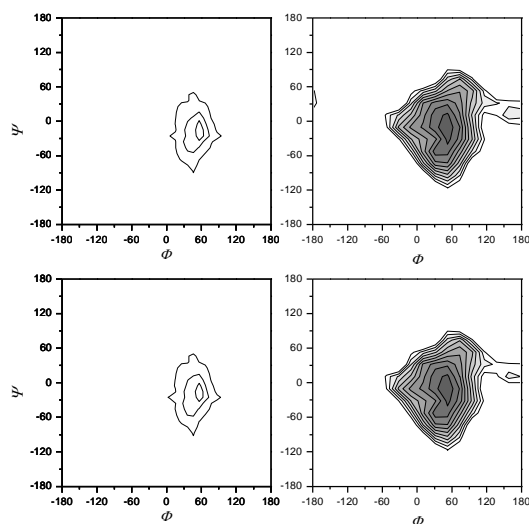


Figura 2.18. Mapas de energía adiabático (derecha) y mapas de distribución de probabilidad (izquierda) calculados para **20** (arriba) y **21** (abajo). Las cotas se muestran cada 3KJ mol^{-1} para la energía, y 10, 5.5 y 1% para la probabilidad.

Los mapas calculados para **20** y **21** (figuras 2.18), utilizando la misma metodología que para los otros derivados de pinitol, mostraron comportamientos conformacionales muy similares entre si y semejantes a los de su análogo **15**. En ambos compuestos predomina casi

exclusivamente un mínimo amplio de tipo *syn*- Ψ sin predecirse poblaciones apreciables de otras conformaciones alternativas como *anti*- Ψ ó *anti*- Φ .

Los resultados de estos modelos teóricos fueron contrastados con los datos experimentales de NOE. La presencia del NOE característico de la conformación *syn*- Ψ (H1'-H6) junto con la ausencia del exclusivo de las orientaciones *anti*- Ψ (H1'-H5) y la observación del H1'-H1, también esperado aunque no exclusivo, están completamente en acuerdo con las superficies de energía potencial y de distancias interprotónicas calculadas.

El estudio teórico se completó con simulaciones de dinámica molecular como se hizo en el caso de **18** y **19**. Para ello se emplearon idénticas condiciones de cálculo que las optimizadas para sus análogos α , esto es: dinámicas estocásticas, usando el modelo GB/SA, y con las dos parametrizaciones disponibles para AMBER*. Desde el punto de vista del rendimiento y comportamiento de las simulaciones, los resultados en cuanto a estabilidad, evolución y equilibración del enlace glicosídico, torsiones exocíclicas y balance energético, fueron normales y similares a los obtenidos para **18** y **19**. Las trayectorias de los ángulos Φ y Ψ visitan la misma región *syn*, que también es la más estable según las superficies adiabáticas y que corresponde a la zona para la que se esperarían los NOEs observados experimentalmente: H1'-H6 y H1'-H1 (Figura 2.19). No se aprecian diferencias evidentes en este comportamiento, ni entre los compuestos **20** y **21** ni entre las dos parametrizaciones del campo de fuerza empleadas, véase Figura 2.19.

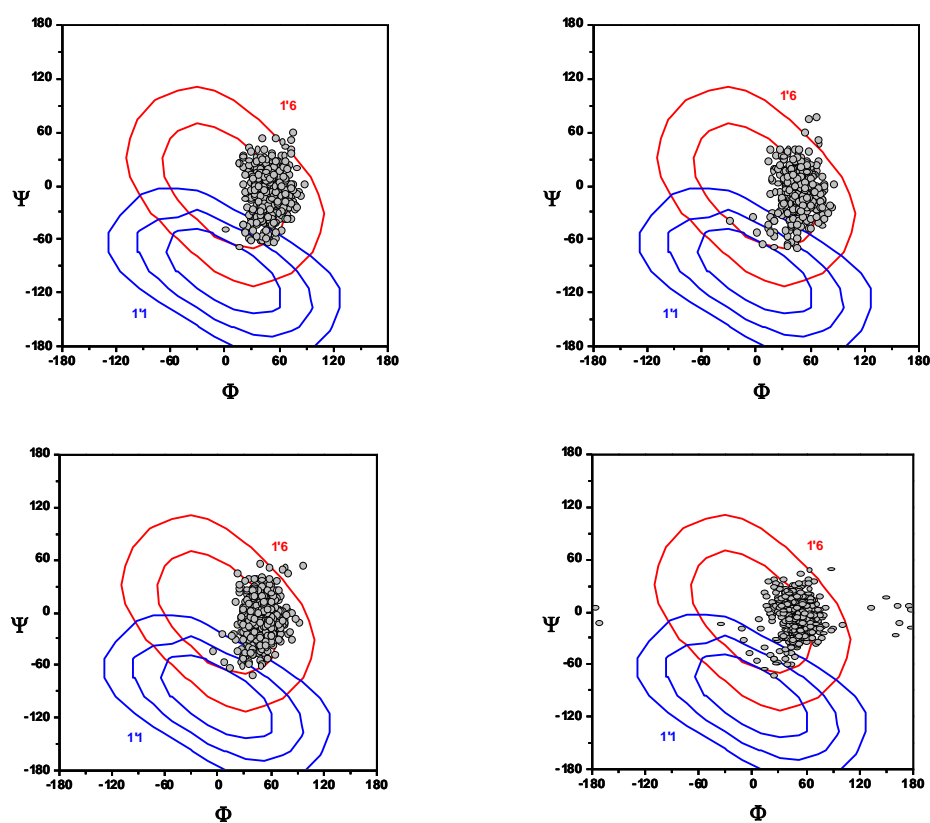


Figura 2.19. Mapas de la distribución de los ángulos de torsión glicosídicos durante simulaciones de 5ns mediante dinámica estocástica, de los compuestos **20** (arriba) y **21** (abajo) empleando las parametrizaciones de Senderowitz et al (izda) y Homans (derecha), junto con la superposición de los NOEs exclusivos para la conformación *syn*- Ψ ($H1'$ - $H6$ y $H1'$ - $H1$).

En la comparación de las distancias experimentales y las calculadas, de nuevo se observa (tabla 13) un mejor acuerdo con los promedios obtenidos de las dinámicas estocásticas con respecto a las distancias calculadas a partir de las estructuras relajadas. Esta diferencia es mayor para el par $H1'$ - $H1$.

Tabla 13. Distancias clave interprotónicas experimentales y estimadas a partir de cálculos de mecánica y dinámica molecular empleando las parametrizaciones de Senderowitz et al y Homans para los compuestos **20** y **21**.

Par Protones		20	19
H1' – H6	Experimental, RMN	(2,6)	(2,3)
	(SD) Senderowitz $\varepsilon = 80$	2,4	2,4
	(SD) Senderowitz GB/SA	2,4	2,4
	(MM) Senderowitz GB/SA	2,3	2,3
	(SD) Homans GB/ SA	2,4	2,4
	(MM) Homans GB/ SA	2,3	2,4
H1' –H1	Experimental, RMN	(3,3)	(3,2)
	(SD) Senderowitz $\varepsilon = 80$	3,7	3,6
	(SD) Senderowitz GB/SA	3,6	3,7
	(MM) Senderowitz GB/SA	3,7	3,7
	(SD) Homans GB/ SA	3,6	3,7
	(MM) Homans GB/SA	4,0	3,9

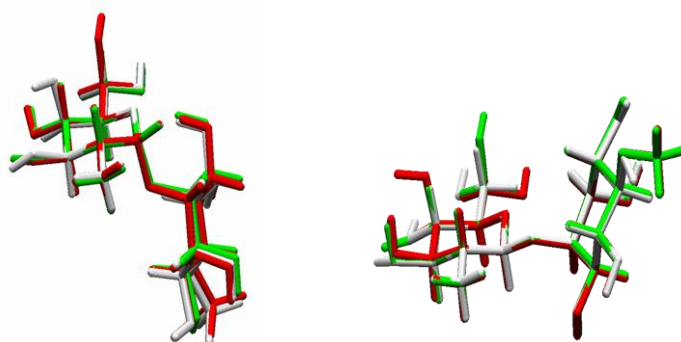


Figura 2.20. Estructuras de superposición de **18** (rojo), **19** (blanco) y **13** (verde) en la figura de la izquierda y **20** (rojo), **21** (verde) y **16** (blanco) a la derecha, utilizando como criterio el rmsd más pequeño de los átomos pesados de la hexosamina.

A nivel general, la unión glicosídica los compuestos **18-21**, presentan el mismo comportamiento conformacional que los compuestos pseudodisacarídicos **13-17** que contenían D-*quiro*-inositol. Esto queda perfectamente visible en la superposición de las estructuras de mínima energía (Figura 2.20) obtenidas de la mecánica molecular para cada tipo de unión glicosídica (α ó β), con las correspondientes estructuras análogas de D-*quiro*-inositol (sin la inclusión del grupo -OCH₃ de los pinitoles).

2.3.7.- Modelado Molecular de los grupos Hidroximetilo.

Los grupos hidroximetilo de piranosas presentan tres posibles rotámeros (Figura 2.21) cuyas poblaciones relativas son función principalmente de la configuración gluco- o galacto del hidroxilo en posición 4. El análisis de unas 101 estructuras de derivados de glucosilpiranósidos por técnicas de difracción de rayos X, indica una distribución de rotámeros de 60:40:0 (gg/gt/tg).⁷³ Ejemplos específicos en distribuciones de rotámeros en fase gas empleando metil α -D-glucopiranósido y metil α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6) α -D-glucopiranósido, indican poblaciones de 57:38:5 y 70:29:1 respectivamente.⁷⁴ Por el contrario los derivados galactopiranósidos muestran distribuciones de rotámeros marcadamente diferentes. Así el rotámero tg posee una gran componente, a expensas del gg. Por ejemplo el metil α -D-galactopiranósido y el α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6) α -D-galactopiranósido, muestran valores de 14:47:39 y 16:53:31 (gg/gt/tg), respectivamente.

La tendencia de los ángulos ω para adoptar conformaciones *gauche* en glucopiranósidos han sido atribuidas al denominado efecto *gauche*⁷⁵ que fue descrito como la tendencia que poseía una molécula para adoptar la estructura que poseyera el máximo número de interacciones *gauche* entre los pares de electrones adyacentes y/o enlaces polares. Otra definición utilizada lo define como una propiedad estereoelectrónica interna o hiperconjugativa de los fragmentos X-C-C-Y, donde X e Y son átomos electronegativos y que se encuentra dentro del origen propuesto para el efecto anomérico⁷⁶.

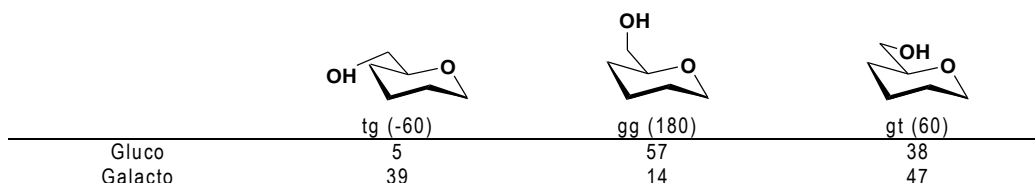


Figura 2.21. Rotámeros del hidroxilo primario (gg, gt, tg), definidos respecto al ángulo torsional definido por H5-C5-C6-O6, y poblaciones del metil α -D-glucopiranósido y del metil α -D-galactopiranósido.

El modelado de los grupos hidroximetilo es, sin duda, uno de los puntos débiles de la química computacional en azúcares. En el momento de comenzar esta tesis estaba comúnmente aceptado que la influencia de factores difíciles de parametrizar, como efectos de solvatación, no permitía reproducir los resultados experimentales empleando el mismo campo de fuerzas para configuraciones gluco- y galacto-. La mejora del nivel teórico empleando métodos

mecanocuánticos, semiempíricos o ab initio, tampoco reproduce adecuadamente los resultados experimentales. Durante la realización de la presente tesis doctoral R.Woods demostró, empleando parámetros de campo de fuerzas derivados de datos mecanocuánticos³⁶ e incluyendo las interacciones explícitas con el disolvente, que simulaciones de dinámica molecular, reproducen correctamente la estabilidad relativa de los rotámetros.⁷⁷

El inconveniente de la aproximación de Woods es que necesita de simulaciones extraordinariamente largas (50 ns, para compuestos sencillos) por lo que no se deben descartar aproximaciones menos precisas pero más rápidas. En el momento de comenzar estos trabajos no se había descrito la fiabilidad de la parametrización de Senderowitz en este aspecto, por lo que se decidió evaluar sus cualidades en el caso de los compuestos **18-21**.

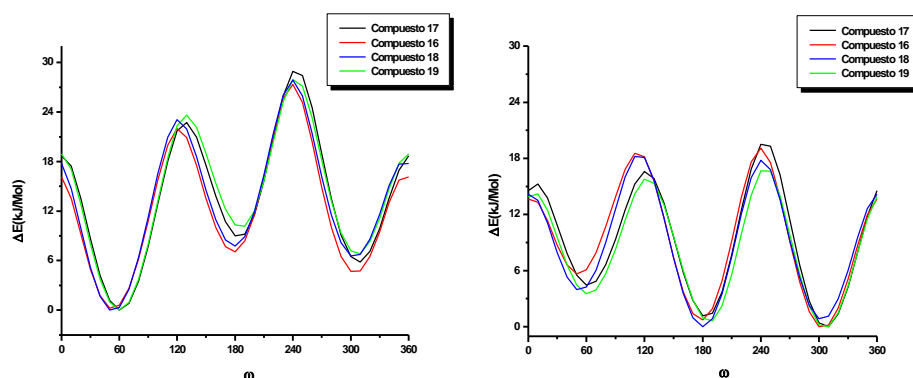


Figura 2.22. Mapas del perfil rotacional ω , para los compuestos **18-21**, con los parámetros de Senderowitz (izda) y Homans (derecha) y con tratamiento electrostático de $\epsilon=80$.

Para ello, en primer lugar se calculó la variación de la energía con el ángulo diedro ω para los compuestos **18-21** empleando los campos de fuerzas de Senderowitz et al. y Homans (Figura 2.22). Estos perfiles energéticos corresponden con las poblaciones a 298 K reflejadas en la tabla 14.

Tabla 14. Distribución de poblaciones de rotámeros de los compuestos **18-21** durante dinámicas estocásticas de 5 ns, realizadas con idéntica estructura de partida empleando diferentes parametrizaciones

Rotámero	19		18		21		20	
	Homans	Sender.	Homans	Sender.	Homans	Sender.	Homans	Sender.
tg 60° ± 60	12	88	6	81	13	92	11	89
gt 300° ± 60	54	9	56	14	50	6	39	7
gg 180° ± 60	34	3	38	6	37	2	50	4

Como cabía esperar por el nivel de la aproximación teórica empleada, ninguna de las dos parametrizaciones fue capaz de reproducir la diferencia en el perfil energético de esta torsión ni para configuraciones gluco ni galacto. Los parámetros de Homans fueron los que proporcionaron un mejor ajuste con el comportamiento esperado para estos compuestos. Ello se debe a que, aunque estos son los parámetros más antiguos, se parametrizaron directamente a los datos experimentales por lo que contienen implícitamente los efectos de solvatación. Por otro lado los parámetros de Senderowitz están basados en cálculos ab initio por lo que sería necesario incluir el efecto del disolvente en los cálculos para considerar todos los factores que intervienen en la estabilidad de los rotámeros.

Con el objeto de evaluar el efecto de la aplicación de modelos sencillos de disolvente implícito se realizaron simulaciones de dinámica molecular estocástica para los compuestos **18-21**, partiendo de los conformeros más estables y empleando ambos campos de fuerzas, y en el caso de los parámetros de Senderowitz dos tratamientos alternativos, $\epsilon=80$ y GB/SA, véase tabla 15.

Tabla 15. Proporción de rotámeros de los compuestos con motivo estructural GlcNH₂ (1→6) D-quiro-inositol, **18 y 19**, analizados de las simulaciones de 5ns de dinámicas estocásticas, con diferentes condiciones; en negrita la conformación inicial del hidroximetilo de las hexosaminas.

		% gg	% gt	% tg
18	Sender. $\epsilon = 80$. gg	9	14	77
	Sender. $\epsilon = 80$. tg	2	8	90
	Sender. GB/SA. gg	8	20	72
	Homans $\epsilon = 80$. gg	36	53	11
	Homans $\epsilon = 80$. tg	22	71	7
19	Sender. $\epsilon = 80$. gt	0	19	82
	Sender. $\epsilon = 80$. tg	0	2	98
	Sender. GB/SA. gg	0	21	79
	Homans $\epsilon = 80$. gt	13	76	11

Del análisis de los compuestos con residuos de glucosamina, (**18** y **19**) destaca la preponderancia de los rotámeros *tg* sobre los otros, cuando se utiliza la parametrización de Senderowitz et al. y de manera independiente al tratamiento electrostático escogido ($\epsilon=80$ ó GB/SA). Las simulaciones de Homans fueron realizadas únicamente sobre las estructuras de mínima energía predichas mediante los cálculos previos de MM y reflejaron siempre un mayor peso de los rotámeros *gt*. En los compuestos con residuo de galactosamina **20** y **21**, se observa una tendencia similar a la de los análogos de glucosamina: predominancia de los rotámeros *tg* para parametrizaciones de Senderowitz y de los *gt* si se utiliza Homans.

Tabla 16. Proporción de rotámeros de los compuestos con motivo estructural GalNH₂ (1→6) D-quirio-inositol, **20** y **21**, analizados de las simulaciones de 5ns de dinámicas estocásticas, con diferentes condiciones; en negrita la conformación inicial del hidroximetilo de las hexosaminas; en el caso de **21** se describen los ángulos Ω del grupo metoxilo de partida.

		% <i>gg</i>	% <i>gt</i>	% <i>tg</i>
20	Sender. $\epsilon = 80$. <i>gg</i>	11	5	84
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>tg</i>	0	4	96
	Sender. GB/SA. <i>gg</i>	3	13	84
	Homans. $\epsilon = 80$. <i>gg</i>	23	56	21
21	Sender. $\epsilon = 80$. <i>gg +60°</i>	14	12	74
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>gg -60°</i>	13	6	81
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>gg 180°</i>	13	6	82
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>gt -60°</i>	0	2	98
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>gt +60°</i>	0	3	97
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>gt 180°</i>	0	5	95
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>tg +60°</i>	5	7	88
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>tg -60°</i>	24	5	71
	Sender. $\epsilon = 80$. <i>tg 180°</i>	5	3	92
	Sender. GB/SA. <i>gt</i>	0	3	97
	Homans $\epsilon = 80$. <i>gg</i>	20	67	13

La presencia del rotámero *tg* en galactopiranosidos a veces es explicada como proveniente de los efectos del disolvente^{13a} ó interacciones 1,3-diaxiales¹⁴ (repulsión estérica y electrónica entre O4 y O6 desestabilizaría el rotámero *gg*). Una interacción equivalente en glucopiranosidos ha sido utilizada para explicar la pequeña población que representa los rotámeros *tg*.⁷⁸

Como hemos visto a lo largo del presente estudio, los parámetros de Homans son los que mejor se ajustan a los datos experimentales, aunque la modificación de Senderowitz esté parametrizada en principio a un mayor nivel teórico. Este resultado refleja la importancia del disolvente en la conformación de los carbohidratos ya que los parámetros de Homans, de por su naturaleza, consideran implícitamente los efectos del disolvente. Por tanto, la realización de

futuras simulaciones con estos compuestos debería incluir moléculas de agua explícita que a buen seguro mejorarán los resultados. El comportamiento dinámico de los compuestos **18-21**, respecto al ángulo torsional ω y con parametrización de Homans queda debidamente reflejado en la figura 24. A lo largo de la trayectoria se observan fluctuaciones entre los rotámeros ω .

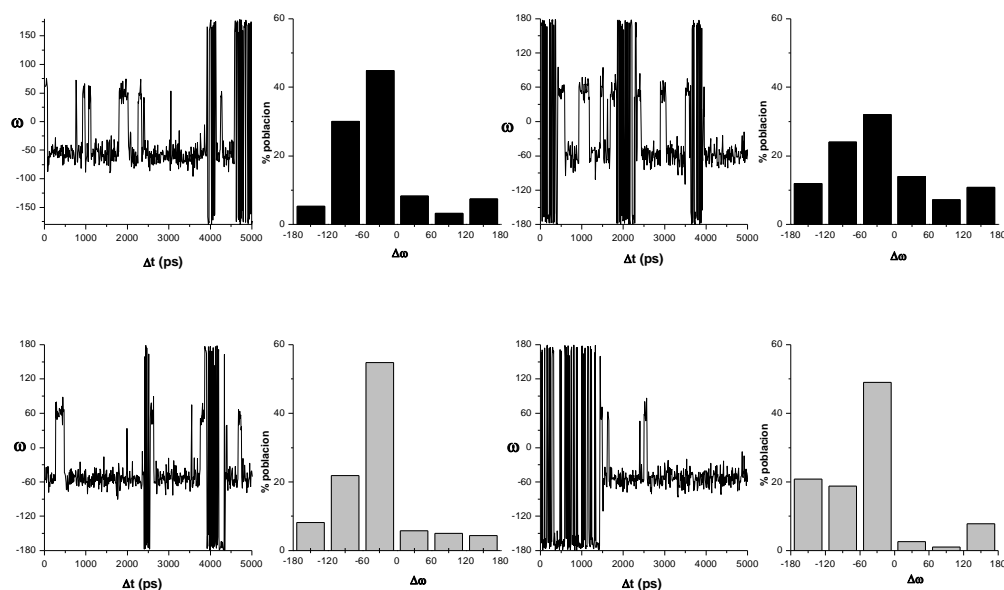


Figura 2.23. Mapas de trayectorias y distribución de poblaciones en % del ángulo ω a lo largo de las simulaciones de SD con parámetros de Homans y $\epsilon=80$, para los compuestos **18** (arriba izda), **20** (arriba derecha), **19** (abajo izda) y **21** (abajo derecha).

2.4.- DISCUSIÓN.

En este capítulo se describe el estudio estructural en disolución de los compuestos disacáridos **9-21**, mediante la combinación de datos experimentales de RMN y cálculos teóricos basados en campos de fuerza realizados sin restricciones experimentales explícitas. En general el acuerdo entre ambos métodos es bueno. Lo que permite, comparaciones cualitativas, correspondiendo los NOEs exclusivos observados con la predicción del cálculo. Esta correlación es también satisfactoria cuantitativamente para los compuestos poco flexibles, en los que el método permite detectar diferencias en detalles sutiles como el desplazamiento de la geometría del mínimo en la serie **13-17**. Sin embargo, en el caso de los compuestos más flexibles la evaluación de la diferencia de energía entre mínimos relativos no es tan adecuada y se sobreestima sistemáticamente la población del conformero *syn*- Ψ , sin que variaciones en el campo de fuerzas o condiciones de cálculo empleadas den una solución totalmente satisfactoria. En cualquier caso, la discrepancia sólo afecta a la energía relativa entre ambas

formas y no a las geometrías predichas. Por lo tanto combinado con datos experimentales, permite realizar análisis comparativos entre compuestos que tengan estructuras similares.

También, se ha realizado paralelamente un análisis de las dos parametrizaciones del campo de fuerzas AMBER* disponibles para carbohidratos en MACROMODEL: Homans y Senderowitz-Parish-Still. En nuestras manos, y para estos compuestos, hemos apreciado que la segunda, más moderna, mejora el balance de energía entre las conformaciones *syn*- y *anti*- Ψ . Por el contrario, en cuanto a la distribución de rotámeros de los grupos hidroximetilo la parametrización Homans coincide mejor con los datos experimentales. Esta discrepancia tiene su origen en la influencia de los efectos de solvatación, no considerados a este nivel de cálculo. Por ello, el campo de fuerzas más antiguo es, paradójicamente, el que mejores resultado proporciona puesto que fue ajustado directamente a datos experimentales.

En cuanto a las estructuras de estos pseudodisacáridos, el estudio comparativo de los compuestos **9-21** permite establecer algunas conclusiones generales. En primer lugar, es posible distinguir dos tipos básicos de comportamiento conformacional bien diferenciados a lo largo de la serie: unos compuestos existen como un único confórmero *syn*- Ψ , distribuido alrededor de un mínimo más o menos amplio, mientras que otros presentan una mayor flexibilidad y se encuentran en un equilibrio entre dos confórmeros, uno *syn*- Ψ , mayoritario, y otro *anti*- Ψ , minoritario. El tipo de ciclitol parece ser determinante en la aparición de uno u otro comportamiento. Así los derivados de *mio*-inositol (**9-12**) son flexibles y presentan dos estructuras (*syn*- Ψ , *anti*- Ψ), experimentalmente observables a través de contactos NOE exclusivos. Tanto los compuestos con *quiro*-inositol como pinitol (3-metil-*quiro*-inositol) (**13-21**) muestran el comportamiento opuesto y se encuentran como un único confórmero *syn*- Ψ . Es importante destacar que esta división de comportamientos no parece verse alterada ni por la estereoquímica α o β , del carbono anomérico, o D- o L- del ciclitol, ni por la presencia de sustituyentes, cargados o no. Por ello, parece lógico atribuir mayoritariamente la causa de tal comportamiento a la estereoquímica axial o ecuatorial del enlace glicosídico respecto al ciclitol.

En segundo lugar, dentro de cada tipo general de comportamiento, algunos detalles estructurales concretos parecen poder ser modulados por la presencia y disposición de los sustituyentes cargados, como se había hipotetizado en el planteamiento de esta memoria. Por ejemplo, la presencia y estructura del grupo fosfato en **13-15** es capaz de desplazar la posición del mínimo absoluto, dentro de la misma estructura general. También, como en el caso de **9** y **10** o **11** y **12**, puede variar las proporciones de los mínimos *syn*- y *anti*- Ψ . Sin embargo, no se han encontrado en ningún caso un efecto tan acusado como el descrito para **2**, en el que no se observa la conformación *anti* porque la interacción fosfato-amonio estabiliza la forma opuesta.

Esto se debe probablemente a que la topología del enlace glicosídico no permite que en el caso de los compuestos estudiados en este capítulo el acceso a la geometría en la que la interacción amonio-fosfato sea óptima.

Por último, se deduce de la comparación entre compuestos con diferencias estructurales lejanas al enlace glicosídico (glucosamina frente a galactosamina, o *quiro*-inositol frente a pinitol) que estas no parecen afectar apreciablemente a la estructura tridimensional de estos disacáridos.

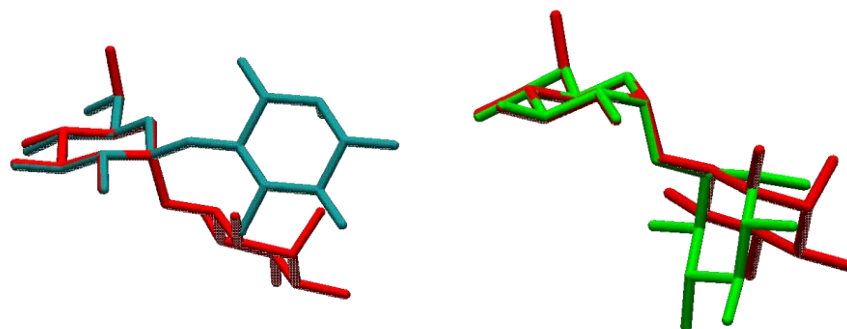


Figura 2.24. Superposición de los esqueletos correspondientes a estructuras de mínima energía de las configuraciones glucosamina (1-6) mio-inositol (izquierda) α (rojo) y β (azul) y glucosamina α (1-6) inositol (derecha) mio- (rojo) y chiro- (verde).

Desde el punto de vista del estudio de las bases estructurales del mecanismo de activación de la insulina via IPGs es destacable la cantidad de diferentes geometrías relativas de los dos anillos que pueden ser generadas por pequeñas variaciones estereoquímicas de sus componentes (Figura 2.24). En este contexto, si se considera este disacárido como el esqueleto sobre el que se sitúan los grupos cargados, supuestos puntos de unión, da lugar a una muy amplia dispersión de geometrías (Figura 2.25). Por otro lado, el estudio descrito en este capítulo, describe la variabilidad de estructuras y comportamientos dinámicos que proporcionan los diferentes motivos químicos considerados con potencial actividad. Esta colección de estructuras fue esencial para realizar los estudios de docking con PKA, realizados en nuestro grupo de investigación, que dieron lugar a nuevos diseños de potenciales insulinomiméticos (Véase Capítulo 3).

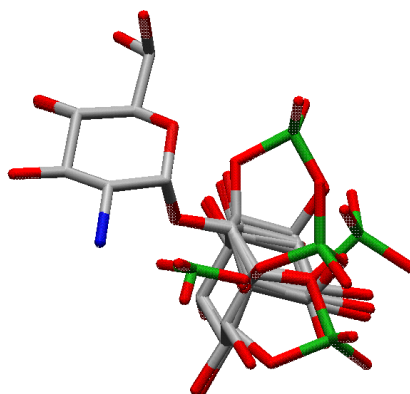


Figura 2.25. Superposición de las estructuras de mínima energía de los compuestos **10**, **12**, **14**, **16** y **17** que contienen algún grupo fosfato. La superposición se ha realizado sobre los átomos pesados del anillo de glucosamina. La figura muestra la dispersión de disposiciones relativas amonio – fosfato originadas por cambios en la estereoquímica del esqueleto.

2.4.- BIBLIOGRAFIA.

- ¹ Ferguson, M.A.J.; Homans, S.W.; Dwek, R.A.; Rademacher, T.W. *Science*. **1988**, 239, (4841), 753-759.
- ² Dietrich, H.; Espinosa, J.F.; Chiara, J.L.; Jimenez-Barbero, J.; Leon, Y.; Varela-Nieto, I.; Mato, J.M.; Cano, F.H.; Foces-Foces, C.; Martin-Lomas, M. *Chem-Eur. J.* **1999**, 5, (1), 320-336.
- ³ Martin-Lomas, M.; Nieto, P.M.; Khair, N.; Garcia, S.; Flores-Mosquera, M.; Poirot, E.; Angulo, J.; Munoz, J.L. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2000**, 11, (1), 37-51.
- ⁴ Chevalier, F.; Lopez-Prados, J.; Perez, S.; Martin-Lomas, M.; Nieto, P.M. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, (16), 3489-3498.
- ⁵ Chevalier, F.; Lopez-Prados, J.; Groves, P.; Perez, S.; Martin-Lomas, M.; Nieto, P.M. *Glycobiology*. **2006**, 16, (10), 969-980.
- ⁶ Lopez-Prados, J.; Martin-Lomas, M. *J. Carbohydr. chem.* **2005**, 24, (4-6), 393-414
- ⁷ Lopez-Prados, J.; Cuevas, F.; Reichardt, N.C.; de Paz, J. L.; Morales, E.Q.; Martin-Lomas, M. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2005**, 3, (5), 764-786.
- ⁸ Cid, M.B.; Alfonso, F.; Martin-Lomas, M. *Synlett*. **2005**, 13, 2052-2056.
- ⁹ Cid, M.B.; Alfonso, F.; Martin-Lomas, M. *Chem-Eur. J.* **2005**, 11, (3), 928-938.
- ¹⁰ Cid, M.B.; Alfonso, F.; Martin-Lomas, M. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, (13), 2303-2307.
- ¹¹ Reichardt, N.C.; Martin-Lomas, M. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2003**, 42, (38), 4674-4677.
- ¹² Cid, M.B.; Bonilla, J.B.; Alfonso, F.; Martin-Lomas, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 18, 3505-3514.
- ¹³ Cid, M.B.; Alfonso, F.; Martin-Lomas, M. *Synlett*. **2003**, 9, 1370-1372.
- ¹⁴ Cid, M.B.; Bonilla, J.B.; Dumarcay, S.; Alfonso, F.; Martin-Lomas, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 5, 881-888.
- ¹⁵ Bonilla, J.B.; Munoz-Ponce, J.L.; Nieto, P.M.; Cid, M.B.; Khair, N.; Martin-Lomas, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 5, 889-898.
- ¹⁶ Martin-Lomas, M.; Khair, N.; Garcia, S.; Koessler, J.L.; Nieto, P.M.; Rademacher, T.W. *Chem-Eur. J.* **2000**, 6, (19), 3608-3621.
- ¹⁷ Martin-Lomas, M.; Flores-Mosquera, M.; Khair, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 8, 1539-1545.

- ¹⁸ Martin-Lomas, M.; Flores-Mosquera, M.; Chiara, J.L. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 8, 1547-1562.
- ¹⁹ Khiar, N.; Martin-Lomas, M. *Carbohydrate Mimics. Concepts and Methods.* **1998**, 433-462.
- ²⁰ Zapata, A.; Leon, Y.; Mato, J.M.; Varela-Nieta, I.; Penades, S.; Martin-Lomas, M. *Carbohydr. Res.* **1994**, 264, (1), 21-31.
- ²¹ Alfonso, F. *Síntesis De Inositolfosfoglicanos. Estudio Del Efecto De Los Sustituyentes En Aceptores Derivados De Chiro-Inositol En La Reactividad, Estereoselectividad Y Regioselectividad De Las Reacciones De Glicosilación.* Universidad de Sevilla, Sevilla, **2003**.
- ²² Lopez-Prados, J. *Inositolfosfoglicanos: Síntesis, Estructura y Actividad Biológica* Universidad de Sevilla, Sevilla, **2005**.
- ²³ Flores-Mosquera, M. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, **2002**.
- ²⁴ Bonilla, J.B. *Segundos Mensajeros Potenciales De La Acción De La Insulina: Síntesis, Estructura y Estudios Biológicos De Glicosil Quiro-Inositoles y Glicosil Fosfatidilinositoles* Universidad de Sevilla, Sevilla, **2004**.
- ²⁵ Mato, J.M.; Kelly, K.L.; Abler, A.; Jarett, L.; Corkey, B.E.; Cashel, J.A.; Zopf, D. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1987**, 146, (2), 764-770.
- ²⁶ Davis, A.L.; Laue, E.D.; Keeler, J.; Moskau, D.; Lohman, J. *J. Magn. Reson.* **1991**, 94, (3), 637-644.
- ²⁷ Bax, A.; Davis, D.G. *J. Magn. Reson.* **1985**, 65, (2), 355-360.
- ²⁸ Wagner, R.; Berger, S. *J. Magn. Reson. Ser. A.* **1996**, 123, (1), 119-121.
- ²⁹ Bothnerby, A.A.; Stephens, R.L.; Lee, J.M.; Warren, C.D.; Jeanloz, R.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, (3), 811-813.
- ³⁰ Willker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bermel, W. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, 31, (3), 287-292.
- ³¹ Schleucher, J.; Schwendinger, M.; Sattler, M.; Schmidt, P.; Schedletsky, O.; Glaser, S.J.; Sorensen, O.W.; Griesinger, C. *J. Biomol. Nmr.* **1994**, 4, (2), 301-306.
- ³² Neuhaus, D.; Williamson, M., *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis.* VCH Publishers (UK) Ltd.: Cambridge, **1989**.
- ³³ Stott, K.; Keeler, J.; Van, Q.N.; Shaka, A.J. *J. Magn. Reson.* **1997**, 125, (2), 302-324.
- ³⁴ Perez, S.; Imberty, A.; Engelsen, S.B.; Gruza, J.; Mazeau, K.; Jimenez-Barbero, J.; Poveda, A.; Espinosa, J.F.; van Eyck, B.P.; Johnson, G.; French, A.D.; Louise, M.; Kouwijzer, C.E.;

Grootenuis, P.D.J.; Bernardi, A.; Raimondi, L.; Senderowitz, H.; Durier, V.; Vergoten, G.; Rasmussen, K. *Carbohydr. Res.* **1998**, 314, (3-4), 141-155.

³⁵ Allinger, N.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, (25), 8127-8134.

³⁶ Woods, R.J.; Dwek, R.A.; Edge, C.J.; Fraserreid, B. *J. Phys. Chem-Us.* **1995**, 99, (11), 3832-3846.

³⁷ Allinger, N.L.; Yuh, Y.H.; Lii, J.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, (23), 8551-8566.

³⁸ Lii, J.H.; Allinger, N.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, (23), 8576-8582.

³⁹ Lii, J.H.; Allinger, N.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, (23), 8566-8575.

⁴⁰ Senderowitz, H.; Parish, C.; Still, W.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, (8), 2078-2086.

⁴¹ McDonald, D.Q.; Still, W.C. *Tetrahedron. Lett.* **1992**, 33, (50), 7743-7746.

⁴² Weiner, P.K.; Kollman, P.A. *J. Comput. Chem.* **1981**, 2, (3), 287-303.

⁴³ Wang, J.M.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, (9), 1157-1174.

⁴⁴ Patra, M.; Karttunen, M. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, (5), 678-689.

⁴⁵ Kaminski, G.A.; Friesner, R.A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W.L. *J. Phys. Chem. B.* **2001**, 105, (28), 6474-6487.

⁴⁶ Jorgensen, W.L.; Tiradorives, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, (6), 1657-1666.

⁴⁷ Halgren, T.A. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, (5-6), 616-641.

⁴⁸ Halgren, T.A. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, (5-6), 520-552.

⁴⁹ Halgren, T.A. *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, (7), 720-729.

⁵⁰ Halgren, T.A.; Nachbar, R.B. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, (5-6), 587-615.

⁵¹ Halgren, T.A. *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, (7), 730-748.

⁵² Halgren, T.A. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, (5-6), 490-519.

⁵³ Halgren, T.A. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, (5-6), 553-586.

⁵⁴ Clark, M.; Cramer, R.D.; Vanopdenbosch, N. *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, (8), 982-1012.

⁵⁵ Imberty, A.; Hardman, K.D.; Carver, J.P.; Perez, S. *Glycobiology.* **1991**, 1, (6), 631-642.

- ⁵⁶ Homans, S.W. *Biochemistry*. **1990**, 29, (39), 9110-9118.
- ⁵⁷ Parish, C.; Senderowitz, H.; Still, W.C. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **1998**, 216, U742.
- ⁵⁸ Ha, S.N.; Giammona, A.; Field, M.; Brady, J.W. *Carbohydr. Res.* **1988**, 180, (2), 207-221.
- ⁵⁹ Wiberg, K.B.; Murcko, M.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, (13), 4821-4828.
- ⁶⁰ Senderowitz, H.; Parish, C.; Still, W.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, (37), 8985-8985.
- ⁶¹ Senderowitz, H.; Still, W.C. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, (5), 1427-1438.
- ⁶² Qiu, D.; Shenkin, P.S.; Hollinger, F.P.; Still, W.C. *J. Phys. Chem. A.* **1997**, 101, (16), 3005-3014.
- ⁶³ Reddy, M.R.; Erion, M.D.; Agarwal, A.; Viswanadhan, V.N.; McDonald, D.Q.; Still, W.C. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, (7), 769-780.
- ⁶⁴ Tvaroska, I.; Perez, S. *Carbohydr. Res.* **1986**, 149, (2), 389-410.
- ⁶⁵ Stortz, C.A.; Cerezo, A.S. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, (20), 1861-1871.
- ⁶⁶ Stortz, C.A. *Carbohydr. Res.* **1999**, 322, (1-2), 77-86.
- ⁶⁷ Vangunsteren, W.F.; Berendsen, H.J.C. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1990**, 29, (9), 992-1023.
- ⁶⁸ Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; Vangunsteren, W.F.; Dinola, A.; Haak, J.R. *J. Chem. Phys.* **1984**, 81, (8), 3684-3690.
- ⁶⁹ Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H.J.C.; Fraaije, J. *J. Comput. Chem.* **1997**, 18, (12), 1463-1472.
- ⁷⁰ Feller, S.E.; Zhang, Y.H.; Pastor, R.W.; Brooks, B.R. *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, (11), 4613-4621.
- ⁷¹ Ryckaert, J.P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. *J. Comput. Phys.* **1977**, 23, (3), 327-341
- ⁷² Asensio, J.L.; Jimenezbarbero, J. *Biopolymers*. **1995**, 35, (1), 55-73.
- ⁷³ Marchessault, R.H.; Pérez, S. *Biopolymers*. **1979**, 18, 2369-2374.
- ⁷⁴ a) Ohrui, H.; Nishida, Y.; Watanabe, M.; Hori, H.; Meguro, H. *Tetrahedron. Lett.* **1985**, 26, 4589-4605. b) Nishida Y.; Ohrui H.; Meguro H. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1575-1578.
- ⁷⁵ Wolfe, S. *Acc. Chem. Res.* **1972**, 5, 102-111.

⁷⁶ a) de Vries, N.K.; Buck, H.M. *Carbohydr. Res.* **1996**, 257, 163-174. b) Epiotis, N.D.; Sarkanen, S.; Bjorkquist, L.; Yates, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 4075-4083. c) Pinto, B.M.; Leung, R.Y.N.; *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*, ed Thatcher, G.R.J. (Am. Chem. Soc., Whashington, DC), 126-155. **1993**.

⁷⁷ Kirschner, K.N.; Woods, R.J. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **2001**, 98, (19), 10541-10545.

⁷⁸ Bock, K.; Duus, J.Ø. *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 14, 513-543.

CAPITULO 3

ESTUDIO DE IPGS POTENCIALES INHIBIDORES DE LA c PKA

3.1.- DISEÑO RACIONAL DE NUEVOS IPGs.

Las actividades biológicas que definen los IPGs de tipo A (caracterizados por contener residuos de *mio*-inositol)⁶⁹⁻³ implican que estos actúen como inhibidores de la cPKA (proteína quinasa dependiente de AMP cíclico)⁴. El que este enzima esté estructuralmente caracterizado y la existencia de estudios detallados de su mecanismo de inhibición a nivel estructural,⁵⁻¹⁹ permitió que en el grupo se comenzara una línea de trabajo dirigida al diseño racional de GPIs inhibidores de cPKA. Este trabajo se basó inicialmente en la combinación de la información estructural existente del mecanismo de inhibición de la subunidad catalítica del cPKA^{20,21} y de su estructura, con la detallada información estructural de los pseudodisacáridos **9-19** descrita en el capítulo 2.^{22,23}

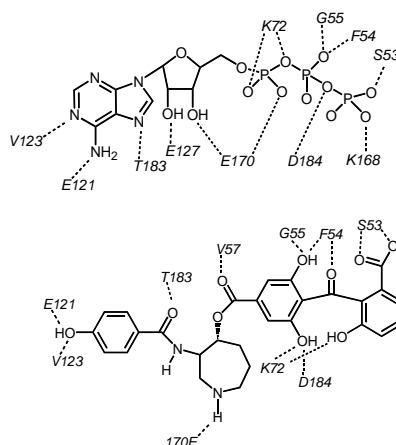


Figura 3.1. Comparación de las interacciones específicas del ATP y el balanol dentro del centro de unión del ATP en la subunidad catalítica de la PKA, de acuerdo a datos cristalográficos de rayos X.

Los estudios de docking en los que se basa el diseño de los compuestos **20-27**, estudiados en el presente capítulo, fueron realizados en nuestro grupo por el Dr. Félix Cuevas.²⁴ Estos estudios se fundamentan en el análisis de los modos de asociación de inhibidores a la subunidad catalítica de la PKA asumiendo que podrían proporcionar información complementaria sobre los requerimientos estructurales de IPGs activos. El modelo elegido fue el balanol, que actúa como mimético del AMP cíclico al que desplaza de su centro de unión, impidiendo así que el enzima sea activado.^{25,26} La estructura del complejo del balanol y la subunidad C de la PKA había sido resuelta revelando las interacciones responsables de su actividad y permitiendo racionalizar el mecanismo de inhibición (figura 3.1).²⁶ Estos análisis han permitido determinar que aunque la afinidad viene determinada por interacciones apolares,

la especificidad viene dada por la disposición de los enlaces de hidrógeno.^{25,26} Figura 2. Comparación de las interacciones del ATP, balanol (basados en cristalografía de rayos X) y un trisacárido de tipo IPG (predicho mediante docking) dentro del centro de unión del ATP en la subunidad catalítica de la PKA. Los estudios de *docking* para **20-22**, se realizaron con el programa AUTODOCK²⁷, y fueron realizados en el centro de unión del ATP de la subunidad C del PKA²⁸. Los resultados mostraron en primer lugar, una alta analogía entre los esqueletos básicos de un pseudotrisacárido de tipo IPG con los del cAMP y de balanol (Figura 3.2). Por otro lado, el estudio indicaba sistemáticamente que la presencia y localización del grupo fosfato constituía un aspecto clave ya que organizaba la orientación del ligando en el centro de unión. Los datos obtenidos entraban en cierta contradicción con las premisas sobre las que se diseñaron los análogos de IPGs sintetizados y estudiados previamente, ya que descartaban la situación del grupo fosfato en el anillo de inositol. Concretamente, las estructuras más adecuadas presentaban un anillo de *mio*-inositol neutro, unido mediante un enlace α a una unidad de glucosamina preferentemente con un grupo fosfato.

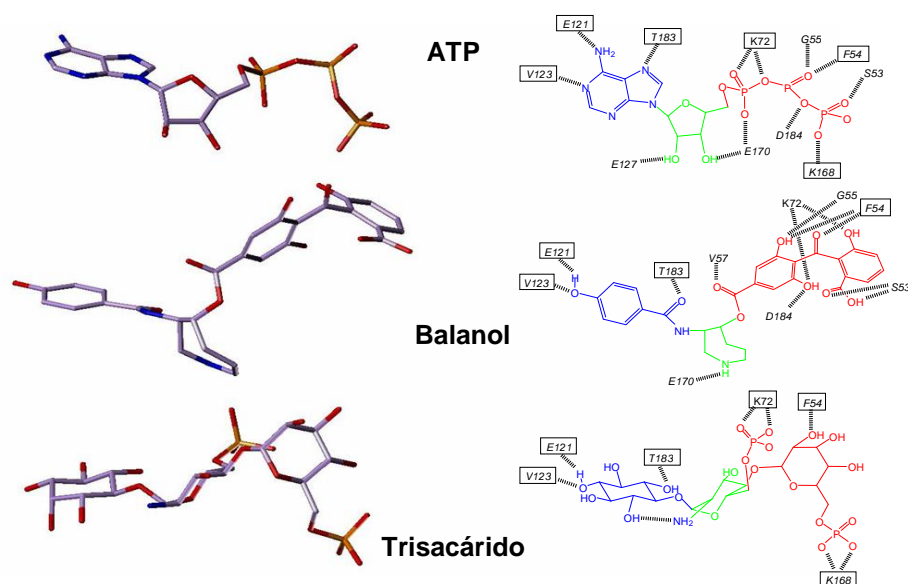


Figura 3.2. Comparación de las interacciones del ATP, balanol (basados en cristalografía de rayos X) y un trisacárido de tipo IPG (predicho mediante docking) dentro del centro de unión del ATP en la subunidad catalítica de la PKA.

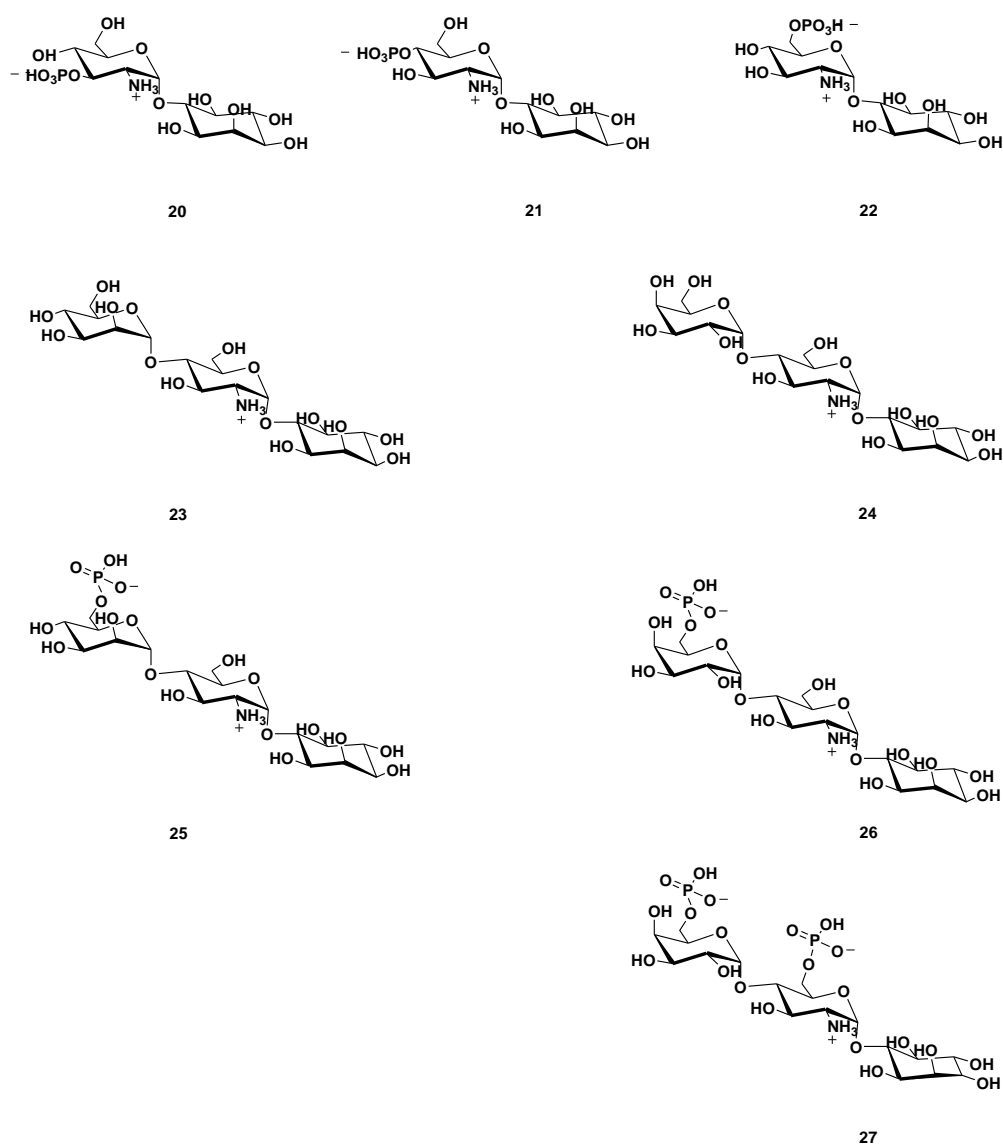


Figura 3.3. Estructuras de los disacáridos y trisacáridos estudiados en este capítulo.

Estas conclusiones se aplicaron en el diseño de una nueva serie de pseudodi- y trisacáridos, **20**, **21**, **22**, **25**, **26** y **27**, que contienen grupos fosfato; también se sintetizaron productos análogos sin grupos fosfato **23** y **24**, por motivos de comparación (figura 3.3).^{24,29,30}

En este capítulo se describe el estudio estructural en disolución de estos compuestos mediante RMN y dinámica molecular. El objeto de este estudio es fundamentalmente

comprobar que las estructuras de estos compuestos concuerdan con las predichas por y para el estudio de docking. Simultáneamente también se propone analizar la posible influencia sobre la estructura tridimensional del GPI de la presencia de grupos O-fosfato en otros residuos distintos del inositol.

3.2.- METODOLOGÍA

3.2.1.- Resonancia Magnética Nuclear.

Los pseudodisacaridos y pseudotrisacaridos **20-27** han sido estudiados en disolución mediante espectroscopía de RMN. En primer lugar, la asignación inambigua de sus espectros de ^1H y ^{13}C , se realizó empleando técnicas habituales para oligosacáridos.³¹⁻³⁶ Se usaron esencialmente los siguientes tipos de experimentos DQF-COSY,³⁷ TOCSY,³⁸ NOESY³⁹ y HSQC⁴⁰. Posteriormente se extrajeron restricciones experimentales basadas en constantes de acoplamiento (torsiones) o de distancia calculadas a partir de la velocidad de relajación cruzada (NOE). Debido a que los métodos son comunes, se remite al capítulo 2 para una descripción más exhaustiva de estas técnicas. En este capítulo también se exploró la observación de los protones hidroxílicos como potencial fuente de nuevas restricciones experimentales (véase apartado 3.4).

3.2.2.- Cálculos Teóricos.

La metodología empleada inicialmente en los estudios de modelado molecular en este capítulo fue en general similar a la descrita en el capítulo anterior. En primer lugar, se estudiaron las superficies de energía de los enlaces glicosídicos mediante métodos sistemáticos, calculando los mapas rígidos, relajados y adiabáticos.⁴¹ En el caso de los trisacáridos, se asumió que no había interacciones significativas a largo alcance y que, por lo tanto, las propiedades conformacionales de una unión dada son independientes de que forme parte de di- o tri-sacáridos. Por ello, teniendo en cuenta los mapas elaborados en el capítulo 2 sólo fue necesario considerar tres disacáridos independientes: Gal- $\alpha(1\rightarrow6)$ -GlcN-1-OMe, Man- $\alpha(1\rightarrow6)$ -GlcN-1-OMe y GlcN- $\alpha(1\rightarrow6)$ -*mio*-inositol (figura 3.4). De acuerdo con la evaluación de los campos de fuerza realizada en el capítulo anterior se empleó AMBER*⁴²

incluyendo la parametrización de Stille,⁴³ y aplicando el método GB/SA⁴⁴ como modelo continuo de disolvente.

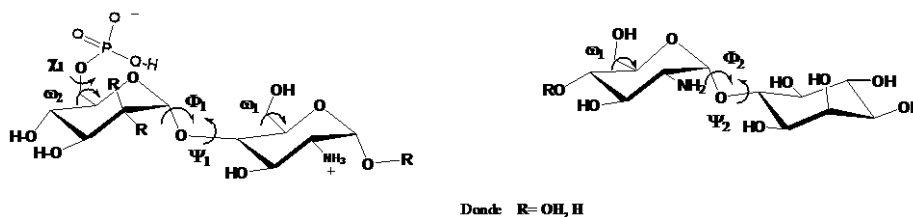


Figura 3.4. Disacáridos modelos de las uniones glicosídicas de los trisacáridos 23-27 empleados en los cálculos de MM.

El estudio conformacional se completó mediante simulaciones de dinámica molecular en las condiciones optimizadas para los compuestos 7-19 descritas en capítulo 2. En este caso, se decidió aplicar sistemáticamente esta metodología a todos los compuestos ya que debería proporcionar una descripción más realista que la búsqueda sistemática complementando sus conclusiones. De acuerdo con las condiciones de simulación optimizadas en el capítulo anterior para los derivados de pinitol 16-19, se emplearon dinámicas moleculares de Langevin⁴⁵ partiendo de las estructuras de mínima energía inferidas de los estudios sistemáticos de mecánica molecular. Por último, en un intento por avanzar en la comprensión de las propiedades dinámicas de las estructuras se han evaluado simulaciones de dinámica molecular empleando modelos de disolvente explícito.⁴⁶

Modelización molecular con inclusión de agua explícita.

Este procedimiento se basa en la consideración explícita de moléculas del disolvente en las simulaciones, de forma que solvaten a dicho soluto, permitiendo calcular las interacciones soluto-disolvente de manera más adecuada.

Sin embargo tiene el inconveniente de generar asimetrías en las interfases “soluto-vacío” que deben ser tratadas adecuadamente. Ello se resuelve de forma sencilla mediante la aplicación de condiciones de frontera periódicas (PBC; *Periodic Boundary Conditions*)⁴⁷. Las simulaciones se llevaron a cabo a 298 K, con una constante de acoplamiento al baño térmico de 0.2 ps, una constante dieléctrica de 1, y aplicando una distancia de truncado para las interacciones de no-enlace de 9 Å. Con el objeto de realizar las simulaciones con el mayor rigor posible, se calcularon las cargas atómicas puntuales específicas para las estructuras

simuladas⁴⁸ y se cuidó el proceso de solvatación y equilibración empleando protocolos suficientemente contrastados.⁴⁹

3.3.- RESULTADOS.

3.3.1.- PSEUDODISACÁRIDOS FOSFATO.

Estudio por RMN de los disacáridos 20-22 (ver figura 3.3).

Los compuestos **20-22** han sido asignados (tabla 3.1) mediante las técnicas de RMN descritas en el apartado de metodología.

Tabla 3.1. Desplazamientos químicos de ^1H (δ (ppm)) y ^{13}C (δ (ppm)) en D_2O , de los compuestos **20**, **21** y **22** a 25°C y a 500 MHz, a valores de pH de 6.3 para **22**, 5.5 para **21** y 5.6 para **20**.

	20	21	22		20	21	22
	δ (^1H)	δ (^1H)	δ (^1H)		δ (^{13}C)	δ (^{13}C)	δ (^{13}C)
Glucosamina							
H-1	5,39	5,40	5,39	C-1	96,6	96,2	96,5
H-2	3,40	3,37	3,36	C-2	54,3	54,3	54,4
H-3	4,36	4,07	3,90	C-3	73,1	69,2	69,4
H-4	3,64	3,98	3,63	C-4	68,9	72,7	68,8
H-5	4,07	4,10	4,14	C-5	71,6	71,3	71,4
H6a/H6b	3,82	3,88	4,11	C-6	59,8	59,8	63,1
	3,77	3,73	3,98				
mio-inositol							
H-1	3,73	3,71	3,70	C-1	71,6	71,6	71,6
H-2	3,98	3,99	3,99	C-2	72,4	72,4	72,4
H-3	3,50	3,49	3,49	C-3	70,9	70,9	70,9
H-4	3,60	3,61	3,62	C-4	72,6	72,5	72,6
H-5	3,40	3,36	3,35	C-5	72,5	72,6	72,6
H-6	3,69	3,69	3,70	C-6	80,5	80,4	80,6

En el caso de estos compuestos (**20-22**), y a diferencia de lo observado para los pseudodisacáridos estudiados en el capítulo 2, los nuevos productos presentaron espectros 1D- ^1H con señales muy anchas en un amplio rango de pH. Esto dificultó la estimación directa de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ y hubo que recurrir para su medida a los experimentos 2D-DQF-COSY. Los valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H,H}}$, confirmaron que, como era previsible, ambos residuos se encontraban en una conformación de tipo silla en los tres compuestos, concretamente del tipo $^4\text{C}_1$ para el anillo de glucosamina.

Para el análisis cualitativo de los datos de RMN para los disacaridos **20-22** se empleó el mismo mapa de distancias que el calculado para los compuestos **9-10** (capítulo 2) que contienen el mismo esqueleto básico. Ello, implica asumir que la presencia del grupo fosfato en posiciones alejadas del enlace glicosídico no debería producir grandes modificaciones en la estructura de los compuestos. La validez de esta suposición quedó confirmada por las simulaciones de dinámica molecular realizadas posteriormente. Por lo tanto, y tal y como se encontró para los compuestos **7** y **8**, la presencia de las conformaciones de tipo *syn-Ψ* quedaría determinada por la observación del NOE H1'-H6, mientras que las disposiciones tipo *anti-Ψ*, lo serían por los NOEs H1'-H5 y H1'-H1. De nuevo, este último contacto NOE (H1'-H1) no es exclusivo de la conformación *anti*, puesto que solapa parcialmente con la región central, asignada a la conformación *syn* (ver figuras 2.9 y 2.10).

En los experimentos NOESY de los compuestos **20-21** (figura 3.5), se observó un fuerte NOE entre H1'-H6, característico de disposiciones de tipo *syn-Ψ*. Por otra parte, también se apreció un NOE débil entre H1'-H5, en este caso, exclusivo de la conformación *anti-Ψ*. Por último, el NOE entre H1'-H1, sólo pudo detectarse de manera inambigua para **20** y **21**, mientras que en el caso de **22** el solapamiento H1 y H6 no permitió una caracterización indiscutible. La presencia simultánea de NOEs exclusivos de conformaciones diferentes (H1'-H6 y H1'-H5), es incompatible con la formulación de un comportamiento monoconformacional, lo que implica la existencia de un equilibrio conformacional. La mayor intensidad relativa del NOE exclusivo de la conformación *syn* (H1'-H6) respecto a los característicos de la disposición *anti* (H1'-H5) indica la forma *syn* es la mas poblada en dicho equilibrio. Este comportamiento no difiere cualitativamente del presentado por los compuestos **7** y **8** que poseen el mismo esqueleto básico GlcN- α -*mio*-inositol.

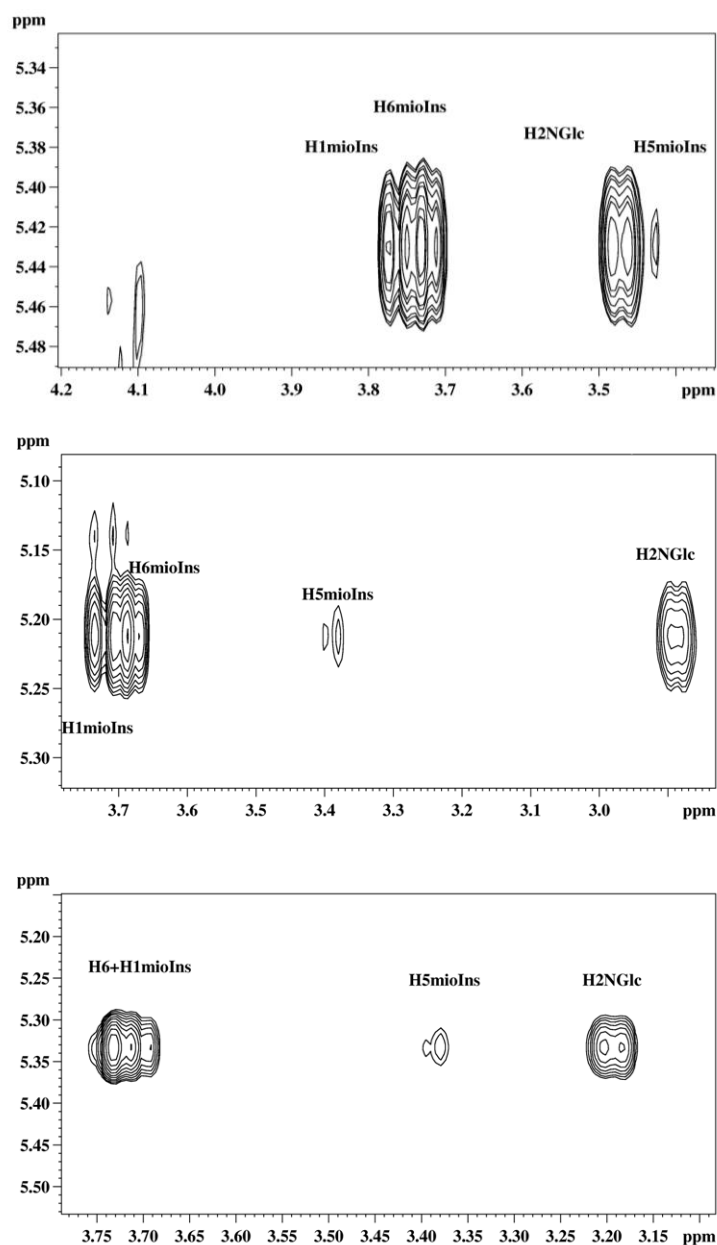


Figura 3.5. NOEs relevantes de la región anomérica de experimentos NOESY para **20** (superior), **21** (central) y **22** (inferior), a 500 MHz y 298K, en D_2O y registrados con un tiempo de mezcla de 500 ms.

El análisis cuantitativo de las distancias interprotónicas experimentales parece reflejar ligeras diferencias con el disacárido básico **7** (tabla 3.2). La menor distancia calculada entre H1'-H5 para el caso de **7** y **22**, frente a **20** y **21**, indicaría una mayor proporción de la conformación *anti* en el equilibrio conformacional para los primeros.

Tabla 3.2. Distancias interprotónicas experimentales determinadas a partir de NOE para los compuestos **7**, **20**, **21** y **22**.

Compuesto	Distancias Interprotónicas	Distancias Experimentales
20	H1'-H6	2,3
	H1'-H1	3,0
	H1'-H5	3,8
21	H1'-H6	2,3
	H1'-H1	2,9
	H1'-H5	3,7
22	H1'-H6	Solap.
	H1'-H1	Solap.
	H1'-H5	3,3
7	H1'-H6	Solap.
	H1'-H1	Solap.
	H1'-H5	3,41

Estudio Teórico de los pseudodisacáridos fosfato 20-22.

Los estudios teóricos de los pseudodisacáridos fosfato **20-22**, se realizaron empleando simulaciones de dinámica molecular de Langevin (dinámicas estocásticas) y el método GB/SA para la simulación del disolvente. Estas condiciones fueron las más adecuadas para estructuras similares como se ha descrito en el capítulo 2. En este estudio también se incluyó el compuesto **7** con fines comparativos. Como punto de partida de estas simulaciones se eligieron las estructuras relajadas correspondientes a conformeros de tipo *syn-Ψ* y *anti-Ψ*, construidas a partir de los resultados de los mapas adiabáticos previamente calculados para el compuesto **7**.

Los resultados obtenidos para **7** (figura 3.6), no consiguieron reproducir satisfactoriamente los resultados experimentales ya que no se observaron visitas a regiones *anti-Ψ* durante la dinámica y éstas fueron demostradas experimentalmente por la observación del NOE H1'-H5 (*cap.* 2). Este resultado fue independiente de la geometría de la estructura de partida, y se reprodujo tanto partiendo de mínimos *syn* ó *anti*, demostrando que en estas condiciones de simulación, el mínimo *anti-Ψ* no era estable. Esta anomalía es análoga a la infravaloración del mínimo *anti-Ψ* observada en el análisis de las superficies adiabáticas de energía realizado en el capítulo 2.

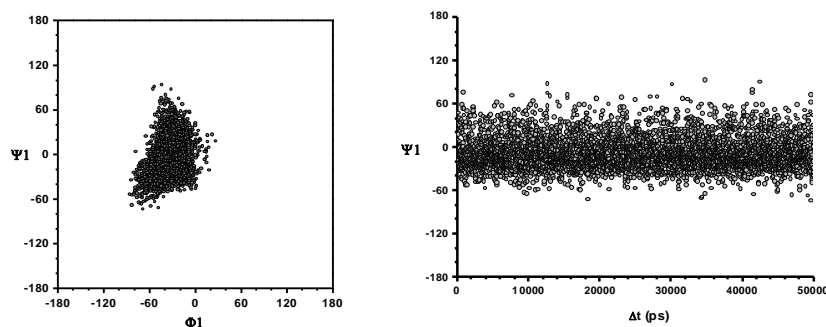


Figura 3.6. Trayectorias del ángulo Ψ_1 y valores instantáneos de Φ, Ψ durante las dinámicas estocásticas (50ns) para el compuesto **7** partiendo desde el mínimo syn- Ψ .

En el caso de los compuestos **20-22**, el comportamiento durante las simulaciones fue diferente, observándose transiciones esporádicas hacia regiones *anti*- Ψ tanto partiendo desde estructuras tipo syn- Ψ (figura 3.7) como desde *anti*- Ψ (datos no mostrados). Por lo tanto, al menos cualitativamente, las simulaciones de los derivados sustituidos fueron capaces de reproducir el equilibrio conformacional determinado experimentalmente. En este sentido es interesante destacar que este comportamiento depende cualitativamente de la posición del grupo fosfato en el residuo glucosamina (figura 3.7 y tabla 3.3)).

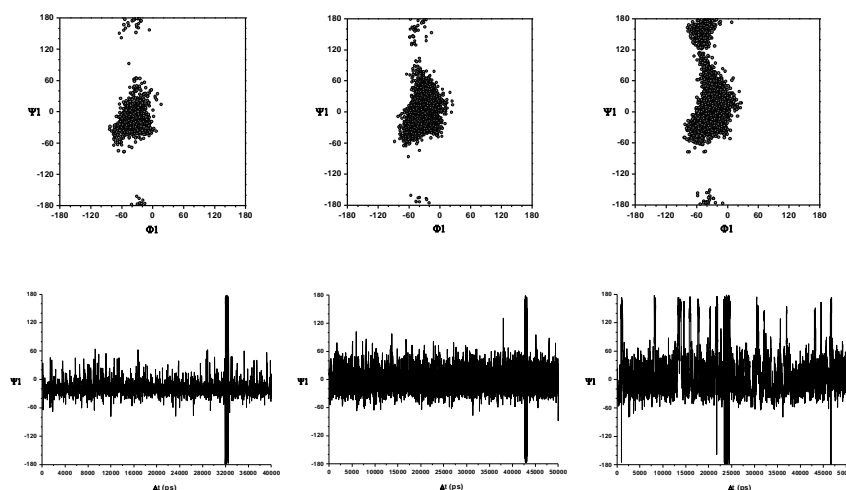


Figura 3.7. Simulaciones de dinámicas estocásticas (50ns) para el compuesto **20** (izda), **21** (centro) y **22** (derecha), con el campo de fuerzas AMBER*, parametrización de Senderowitz et al. y método electrostático GB/SA, partiendo desde el mínimo syn- Ψ . En la parte inferior se muestra las interconversiones del ángulo Ψ a lo largo de la simulación.

Tabla 3.3. Proporción de confórmeros de tipo *syn-Ψ* / *anti-Ψ*, obtenidos de las simulaciones de SD (50 ns), para los compuestos **20-22**.

Compuesto	SD	% <i>syn-Ψ</i>	% <i>anti-Ψ</i>
20	SD <i>syn-Ψ</i>	98,4	1,6
	SD <i>anti-Ψ</i>	99,1	0,9
21	SD <i>syn-Ψ</i>	99,1	0,9
	SD <i>anti-Ψ</i>	99,7	0,3
22	SD <i>syn-Ψ</i>	91,7	8,3
	SD <i>anti-Ψ</i>	97,3	2,7

El estudio teórico continuó con un análisis cuantitativo de las distancias interprotónicas significativas calculadas a lo largo de las simulaciones y su comparación con las derivadas de los datos de RMN. En la tabla 3.4 se muestran las distancias interprotónicas teóricas y experimentales para los compuestos **7**, **20-21**.

Tabla 3.4. Promedios en $\langle r^6 \rangle$ y en $\langle r^3 \rangle^2$ de las distancias interprotónicas significativas calculadas a partir de las simulaciones de SD, y comparación con las experimentales para los compuestos **20-22**, y **7**.

Compuesto	Distancias Interprotónicas	Exp.	SD <i>syn-Ψ</i> $\langle r^6 \rangle$ / $\langle r^3 \rangle^2$
20	H1'-H6	2,3	2,28/2,30
	H1'-H1	3,0	>4
	H1'-H5	3,8	3,81/ 3,86
21	H1'-H6	2,3	2,27 / 2,29
	H1'-H1	2,9	3,86 / 3,92
	H1'-H5	3,7	4,10 / 4,31
22	H1'-H6	Solap.	2,33 / 2,37
	H1'-H1	Solap.	3,80 / 3,88
	H1'-H5	3,3	3,41 / 3,84
7	H1'-H6	Solap.	2,28/2,31
	H1'-H1	Solap.	>4
	H1'-H5	3,41	3,81/3,86

En general, el acuerdo entre las distancias experimentales y los promedios durante las trayectorias de las dinámicas moleculares son buenos para la distancia promedio más corta (H1'-H6). Que es la que caracteriza al mínimo más poblado, *syn-Ψ*. En las distancias correspondientes a los NOEs exclusivos de los confórmeros *anti-Ψ* (H1'-H5), se observa una subestimación de los valores teóricos que corresponde a la infravaloración de la contribución de estas estructuras ya comentada. Por lo tanto atribuible a los campos de fuerza usados. La

diferencias en las poblaciones del conformero minoritario observadas en las simulaciones de los compuestos **7**, **20-22**, y reflejada en las distancias interprotónicas calculadas, no parecen concordar con los datos experimentales, que son similares (tabla 3.4). Sin embargo, en el caso del compuesto **22** y sustituido en posición 6, para el que se predice una mayor población *anti-Ψ* se observó una distancia experimental H1'-H5 mas corta. Desafortunadamente el resto de las distancias interglucosídicas no pudo ser estimado y no es posible tomar esta observación como una conclusión definitiva.

En cualquier caso, e independientemente de la valoración de la analogía con los datos experimentales, es interesante la observación de diferencias en la evaluación de los conformeros en función del patrón de sustitución de compuestos con el mismo esqueleto básico. Mientras que para los compuestos **7-10** no ha sido posible reproducir la existencia de las formas *anti* observadas, en el caso de los análogos fosforilados en el residuo de glucosamina (**20-22**) estas estructuras son estables durante las simulaciones de dinámica molecular. Estas consideraciones parecen indicar que la distribución de cargas en la estructura global resulta determinante en la evaluación del peso relativo del mínimo *anti* en este tipo de estructuras desde el punto de vista de la parametrización del campo de fuerza AMBER*, Este aspecto deberá ser estudiado más exhaustivamente con el fin de mejorar el comportamiento de este campo de fuerzas.

3.3.2.- PSEUDOTRISACÁRIDOS NO FOSFATADOS.

Los estudios estructurales de los pseudotrisacáridos **23** y **24** tienen el interés adicional de permitir determinar la posible influencia de la elongación de la cadena sacarídica en las propiedades conformacionales de la estructura glucosamina-*mio*-inositol. Si esta influencia no fuera importante sería posible extender las conclusiones obtenidas en el capítulo anterior acerca del comportamiento de disacáridos hexosamina-inositol a otras estructuras más complejas que contengan este motivo, como los GPIs de anclaje.

Estudios mediante RMN de los trisacáridos **23** y **24**.

La tabla 3.5 recoge la asignación de los trisacáridos **23** y **24** que ha sido obtenida siguiendo la misma metodología empleada para el resto de los compuestos estudiados en esta memoria.

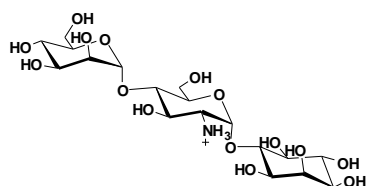
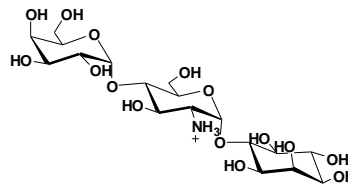
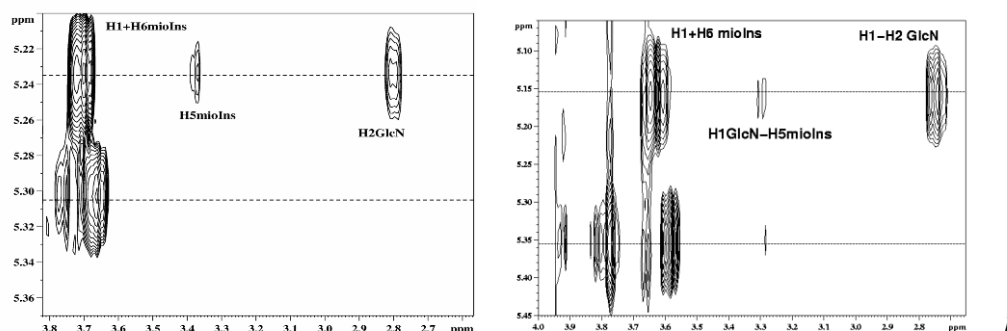
**23****24**

Tabla 3.5. Desplazamientos químicos δ (ppm) de ^1H y ^{13}C y valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ (Hz), para los trisacáridos **23-24** en D_2O , a 500 MHz y 25°C.

	23		24			23		24	
	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$		δ (^{13}C)	δ (^{13}C)		
Hexosa (Gal ó Man)									
H-1	5,39	3,5	5,50	4,4	C-1	100,2	101,6		
H-2	3,80	3,3/ 11,0	4,05	3,9/3,3	C-2	69,7	70,6		
H-3	3,83	10,0/ 2,3	3,80	3,2/8,3	C-3	69,0	70,7		
H-4	3,96	-/ 3,2	3,68	-	C-4	69,5	66,8		
H-5	3,97	-/ 6,0	3,87	-	C-5	72,1	74,0		
H-6a/ H6b	3,70	6,0	3,88	2,3/11,9	C-6	61,5	61,4		
	3,70		3,75			61,5	61,4		
Glucosamina									
H-1	5,19	3,8/ 10,5	5,48	5,1/ 12,3	C-1	100,1	100,0		
H-2	2,78	3,8 /9,0	3,03	3,81	C-2	55,4	55,6		
H-3	3,84	10,6/ 10,3	3,74	3,6/ 9,8	C-3	74,5	74,7		
H-4	3,62	9,1/3,4 2,6	3,64	10,8/ 9,8	C-4	77,5	76,9		
H-5	3,97	10,3/ 2,9	4,09	9,8/ 10,3	C-5	69,5	71,3		
H-6a/ H6b	3,81	3,7	3,81	10,7/2,9	C-6	60,8	60,8		
	3,81	-	3,81	4,4		60,8	60,8		
mio-inositol									
H-1	3,67	-	3,73	10,9	C-1	71,9	71,9		
H-2	3,98	2,8/2,6	4,02	2,8	C-2	72,8	72,8		
H-3	3,48	3,1/10,4	3,74	3,0/ 10,4	C-3	71,3	71,3		
H-4	3,61	10,0/9,8	3,65	10,3	C-4	72,8	72,8		
H-5	3,33	9,4/8,9	3,62	10,7/ 8,4	C-5	73,4	73,3		
H-6	3,66	8,2/7,8	3,69		C-6	80,9	80,9		



espectro 2D-NOESY a un pH de 9,48 y 10,0 respectivamente, con un tiempo de mezcla de 650 ms.

En los experimentos NOESY de **23** y **24** (figura 3.8) se observaron intensamente los picos NOE exclusivos de conformaciones de tipo *syn-Ψ* para los tres tipos de enlaces glicosídicos: H1'-H6 y H1'-H1 para el enlace GlcN-α(1→6)-*mio*-inositol y H1''-H4' para los de la unión Hexosa-α(1→4)-GlcN. En ambos compuestos, también se pudieron distinguir, aunque más débilmente, los picos de cruce característicos de las disposiciones *anti-Ψ*: H1'-H5, y H1''-H3' para GlcN-α(1→6)-*mio*-inositol y H1''-H5' para los dos Hexosa-α(1→4)-GlcN. De nuevo, se observan simultáneamente los NOE exclusivos de ambas conformaciones lo que implica la existencia de un equilibrio conformacional en los dos enlaces glicosídicos de **23** y **24**. Por las intensidades relativas de los picos se puede deducir que las conformaciones *syn-Ψ* son dominantes en este equilibrio. Las distancias interprotónicas experimentales fueron evaluadas a partir de experimentos 1D-NOESY selectivos para **23** y **24**, ver tabla 3.6. En el caso de las señales H1 y H6 del residuo de *mio*-inositol su solapamiento hizo imposible el cálculo de estas distancias de manera aislada.

Tabla 3.6. Distancias interprotónicas experimentales (Å) calculadas a partir de experimentos 1D-dpfgse-NOESY, a 500 MHz, en D₂O y a 25°C para **20** y **21**.

Par Protones	23	24
H1'-H6 + H1	2,1	2,1
H1'-H5	3,1	3,2
H1''-H3'	3,1	3,3
H1''-H5'	3,2	3,8
H1''-H4'	2,7	2,5

Fue posible establecer que la proporción de conformeros minoritarios de tipo *anti-Ψ* debía de ser muy similar para **20** y **21** y a su vez similar al análogo **9** ya que las distancias entre H1' y H5 que caracterizan este mínimo eran muy parecidas (3, 1; 3,2 y 3,4 Å, respectivamente). Desafortunadamente, no fue posible evaluar las distancias características del mínimo absoluto debido al solapamiento de las señales H1 y H6 del inositol. Esta observación implica que las conclusiones de los estudios estructurales glucosamina-inositol realizadas sobre los disacáridos básicos y recogidos en el capítulo 2 serían aplicables a hipotéticas moléculas IPGs mayores.

Cálculos teóricos de los trisacáridos 23 y 24.

Siguiendo la metodología habitual, el estudio se comenzó con un análisis de las superficies de energía potencial asociada a los enlaces glicosídicos considerados independientemente. Puesto que la unión GlcN- α (1 \rightarrow 6)-*mio*-inositol ya había sido estudiada en el capítulo anterior, sólo fue necesario calcular las uniones hexosa- α (1 \rightarrow 4)-GlcN. Los mapas de distribución de probabilidad y las superficies adiabáticas en función de Φ y Ψ combinados con los mapas de distancias interprotónicas clave, para las uniones Gal- α (1 \rightarrow 4)GlcN, y Man- α (1 \rightarrow 4)GlcN se muestran en la figura 3.9. El comportamiento es muy similar para ambas uniones, en ambos casos se observa un mínimo absoluto de tipo *syn-Ψ* caracterizado experimentalmente por el NOE H1''-H4') y un mínimo relativo menos importante de tipo *anti-Ψ* (descrito por los contactos H1''-H3' y H1''-H5').

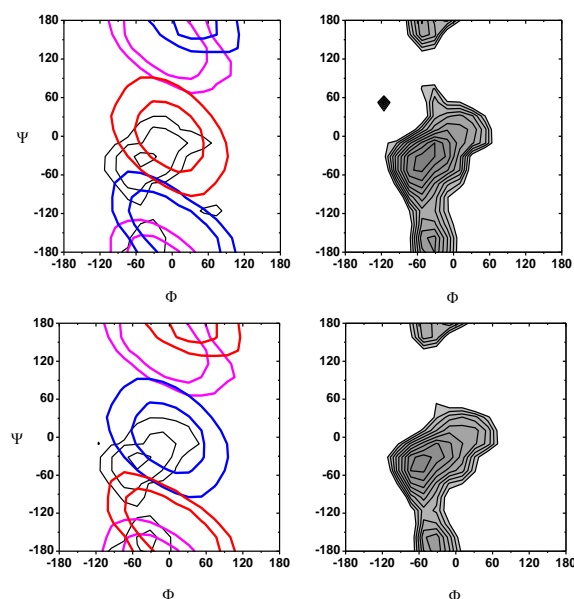


Figura 3.9. Mapas de energía adiabáticos y mapas de distribución de probabilidad conformational superpuestos con las distancias predichas para cada conformación [rojo $H1''-H4'$, azul $H1''-H1'$ y violeta $H1''-H5'$] para la unión Gal-(1→4)-GlcN (arriba para 24) y Man-(1→4)-GlcN [azul $H1''-H4'$, rojo $H1''-H1'$ y violeta $H1''-H5'$] (abajo para 23).

El estudio teórico se amplió con simulaciones de dinámica molecular estocástica (50 ns) empleando las condiciones puestas a punto en los estudios previos de los disacáridos de pinitol (capítulo 2). En este caso, se evaluaron dos tratamientos del disolvente explícito diferentes: $\epsilon=80$ y GB/SA, con el objeto de comprobar cuál reproducía con mayor fiabilidad los datos de RMN. En las figuras 3.10 y 3.11 se muestran los valores tomados durante la dinámica por los ángulos de torsión de los enlaces glicosídicos de **24** y **23**. Cuando se usó $\epsilon=80$, se observó para el enlace Hex- $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcN un equilibrio entre estructuras de tipo *syn-Ψ* y *anti-Ψ*, similar al caracterizado experimentalmente. Por el contrario, para el enlace glicosídico GlcN- $\alpha(1\rightarrow6)$ -*mio*-inositol sólo se observó un único mínimo central de tipo *syn-Ψ*, sin transiciones a conformaciones *anti-Ψ*. En las simulaciones realizadas con método de solvatación GB/SA se observaron transiciones a regiones de tipo *anti-Ψ*, para ambos enlaces glicosídicos. Como se comentará más en detalle posteriormente, estos últimos resultados se ven apoyados por la observación experimental de un NOE exclusivo de disposiciones de tipo *anti* ($H1'-H5$).

Con el fin de comprobar si estas transiciones eran consistentes y reproducibles, se repitió la simulación partiendo de la estructura correspondiente al mínimo relativo *anti*- Ψ para el enlace HexN- $\alpha(1\rightarrow6)$ -*mio*-inositol (figuras 3.11 y 3.13). En esta nueva simulación se produjo a los pocos picosegundos una transición rápida al mínimo más estable, seguida de un comportamiento indistinguible de las dinámicas previas que partieron de un mínimo tipo *syn*.

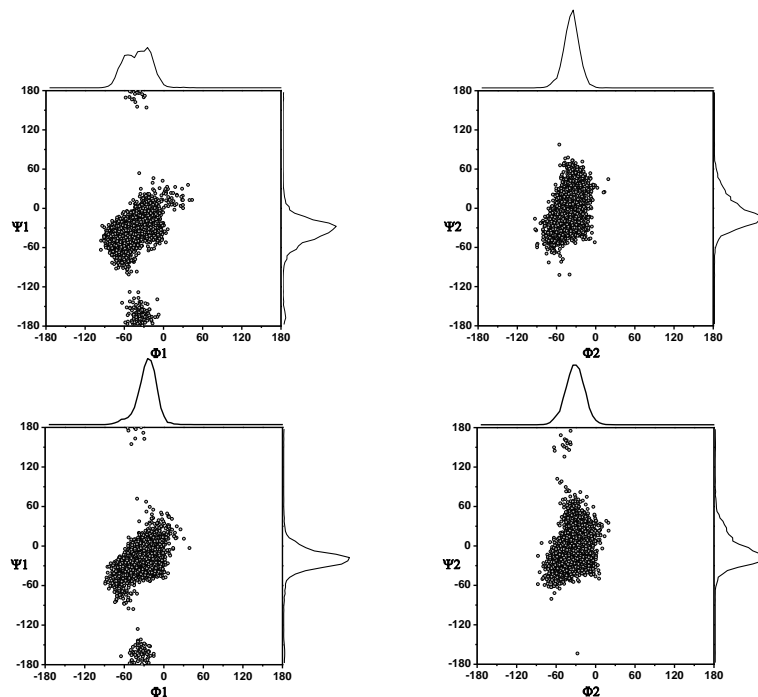
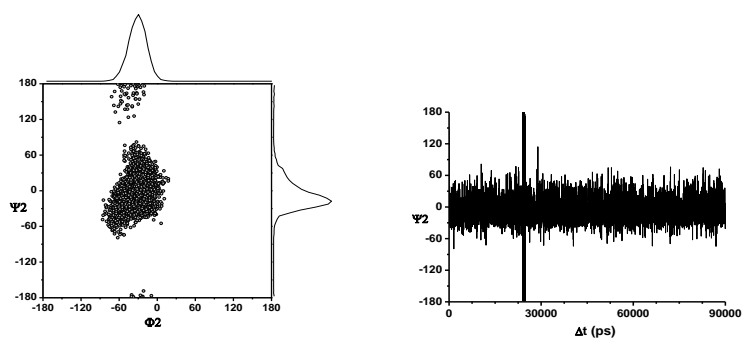


Figura 3.10. Mapas de distribución de valores Φ, Ψ para simulaciones de SD de 24 de 50 ns, con el modelo solvatación $\epsilon=80$ (superior) y GB/SA (inferior).



igura 3.11. Distribución de valores Φ_2 , Ψ_2 (izda) y trayectoria de Ψ_2 frente al tiempo (derecha) para el enlace GlcN- $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -mio-inositol de **24**, durante simulaciones de 90 ns usando como estructura de partida una conformación anti- Ψ_2 .

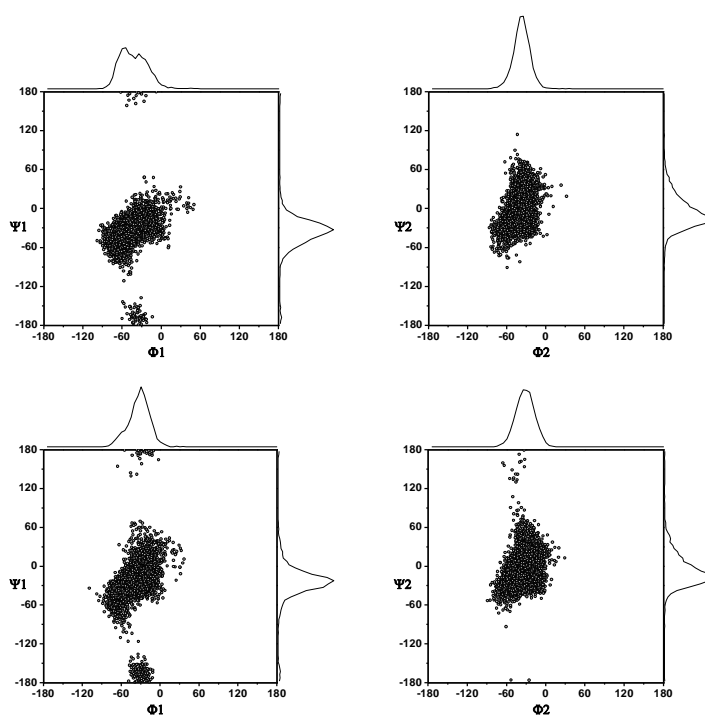


Figura 3.12. Mapas de trayectorias Φ, Ψ para simulaciones de 50 ns de SD de **23** empleando la conformación de partida syn- Ψ , con $\varepsilon=80$ (superior) y GB/SA (inferior).

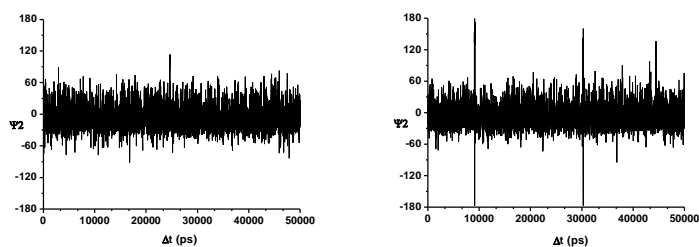


Figura 3.13. Trayectorias del ángulo glicosídico Ψ_2 durante las simulaciones de SD de **23**, con $\varepsilon=80$ (izquierda) y GB/SA (derecha).

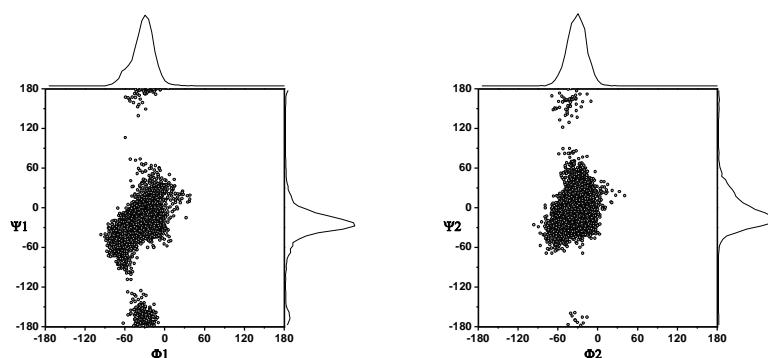


Figura 3.14. Mapas de distribución de valores Φ, Ψ durante dinámicas estocásticas de 90 ns para **24** en la conformación de partida anti- Ψ_3 con el modelo solvatación GB/SA.

Las distancias interglicosídicas calculadas a lo largo de las simulaciones reflejan una gran semejanza entre **23** y **24** para un mismo tipo de tratamiento electrostático independientemente de la estructura de partida empleada. Se observaron discrepancias entre los resultados experimentales y las simulaciones con respecto a las distancias características de los conformeros minoritarios debidas a la subestimación de la población de estos mínimos. Por el contrario en las distancias exclusivas de los conformeros tipo *syn-Ψ* el acuerdo con los resultados experimentales es mejor.

Tabla 3.7. Distancias interprotónicas experimentales y teóricas para **23** y **24**.

Par de Protones		Exp.	SD $\epsilon=80$ <r ⁶ >	SD GB/SA <r ⁶ > <i>syn</i> -Ψ	SD GB/SA <r ⁶ > <i>anti</i> -Ψ
23	H1'-H6	2,1*	2,34	2,29	2,29
	H1'-H5	3,1	3,78	3,82	3,80
	H1''-H3'	3,1	3,22	3,41	3,34
	H1''-H5'	3,2	3,97	3,77	3,62
	H1''-H4'	2,7	2,53	2,38	2,39
24	H1'-H6	2,1*	2,34	2,29	2,30
	H1'-H5	3,2	4,37	3,82	3,75
	H1''-H3'	3,3	3,20	3,63	3,73
	H1''-H5'	3,8	3,83	4,11	4,40
	H1''-H4'	2,5	2,50	2,30	2,29

* Solapado en los espectros de RMN H1'-H6 con H1'-H1.

De este estudio se puede concluir que el empleo de la metodología GB/SA permite reproducir cualitativamente el comportamiento dinámico de estos compuestos en cuanto a la estabilidad de las formas *anti*-Ψ. Sin embargo la población estos conformeros es subestimada sistemáticamente, hecho que queda reflejado en los análisis cuantitativos de distancias.

3.3.3.- PSEUDOTRISACÁRIDOS MONO-FOSFATO.

Estudios por RMN de los trisacáridos 25 y 26. (Ver figura 3.3).

En este caso, al igual que ocurrió con los pseudodisacáridos **20-22** además de los cambios lógicos en el desplazamiento químico en función del pH, se aprecian ensanchamientos acusados de las señales de grupos cercanos a los centros ionizables a valores próximos al pKa para **25** y **26** (figura 3.15). Este comportamiento difiere del de aquellos oligosacáridos en los que el grupo fosfato se encontraba en el anillo de inositol, para los que las señales se desplazaban sin ensanchamientos tan acusados. Esta observación simplemente refleja diferentes cinéticas de los equilibrios ácido-base. En cualquier caso, y desde un punto de vista práctico, este efecto dificultó la realización de los experimentos al limitar el rango de pH de trabajo para resolver el solapamiento de señales clave. La asignación de los compuestos **25** y **26** a pH próximo a 7.0 se realizó por la metodología 2D habitual y se muestra en la tabla 3.8.

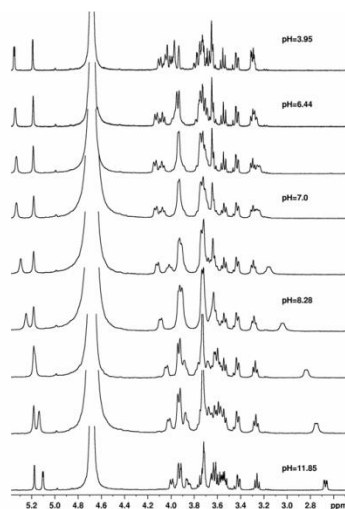


Figura 3.15. Espectros de RMN 1D ^1H del compuesto **22** en D_2O y 25°C , realizados en función del pH.

Tabla 3.8. Desplazamientos químicos δ (ppm) de ^1H y ^{13}C y valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ (Hz), para los trisacáridos **22** y **23** en D_2O , a 500 MHz y 298K.

	25		26			25	26
	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$	δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$		δ (^{13}C)	δ (^{13}C)
Hexosa (Man ó Gal)							
H-1	5,17	2,0	5,39	3,9	C-1	101,2	98,4
H-2	3,94	-	3,85	3,8/ 10,4	C-2	70,4	57,0
H-3	3,71	-	3,85	3,3/ 10,5	C-3	70,4	71,9
H-4	3,66	-	4,04	-	C-4	66,3	78,2
H-5	3,72	5,5 / 7,0	4,15	-	C-5	73,0	72,5
H6a/H6b	4,01	-	3,94	-	C-6	64,2	62,3
	3,94		3,94				
Glucosamina							
H-1	5,33	3,5	5,40	3,4	C-1	96,4	100,8
H-2	3,28	3,5/10,5	3,34	3,7/ 10,3	C-2	54,7	70,8
H-3	4,03	9,5/ 10,5	4,26	10,4/11,2	C-3	69,9	66,2
H-4	3,70	9,5	3,78	9,8 /10,2	C-4	76,1	73,0
H-5	4,10	3,0/ 10,0	4,24	3,1/10,2	C-5	70,9	71,3
H6a/H6b	3,78	12,5/ 2,5	3,90	-	C-6	60,1	71,5
	3,73	12,5/ 3,5	3,84	-			
mio-inositol							
H-1	3,63	-	3,84		C-1	71,8	74,0
H-2	3,91	2,5	3,99	2,5	C-2	72,6	74,8
H-3	3,41	3,0/ 10,0	3,49	2,8/ 10,0	C-3	71,0	73,4
H-4	3,53	9,5	3,61	9,8	C-4	72,8	75,0
H-5	3,27	9,5	3,37		C-5	72,8	75,0
H-6	3,62	-	3,83		C-6	80,6	82,7

Los experimentos NOESY (figuras 3.16 y 3.17), indican que el comportamiento conformacional de los compuestos **25** y **26** puede describirse en términos generales como un equilibrio entre conformaciones *syn*- Ψ / *anti*- Ψ con predominio de las formas *syn*- Ψ para los dos enlaces glicosídicos. En el caso de la unión GlcN- α (1 \rightarrow 6)-*mio*-inositol se aprecia intensamente el NOE exclusivo del mínimo *syn*- Ψ , H1'-H6, mientras que los que caracterizan las formas *anti*- Ψ , H1'-H1 (ligeramente solapado con H1'-H6) y H1'-H5, son de menor intensidad. En el caso del compuesto **25** el NOE H1'-H5, no se pudo detectar inequívocamente debido a que aparece solapado con el correspondiente a H1'-H2'. No obstante la forma compleja del pico de cruce H1'-H2 que sugiere una contribución de H1'-H5 y el pico H1'-H1 se puede considerar un argumento a favor de la detección de la forma *anti*- Ψ . La geometría de la segunda unión glicosídica entre la hexosa correspondiente y la glucosamina queda definida en ambos compuestos por los NOE característicos de las formas *syn*- Ψ (H1''-H4') con mayor intensidad que los propios de las formas *anti* (H1''-H3' junto a H1''-H5').

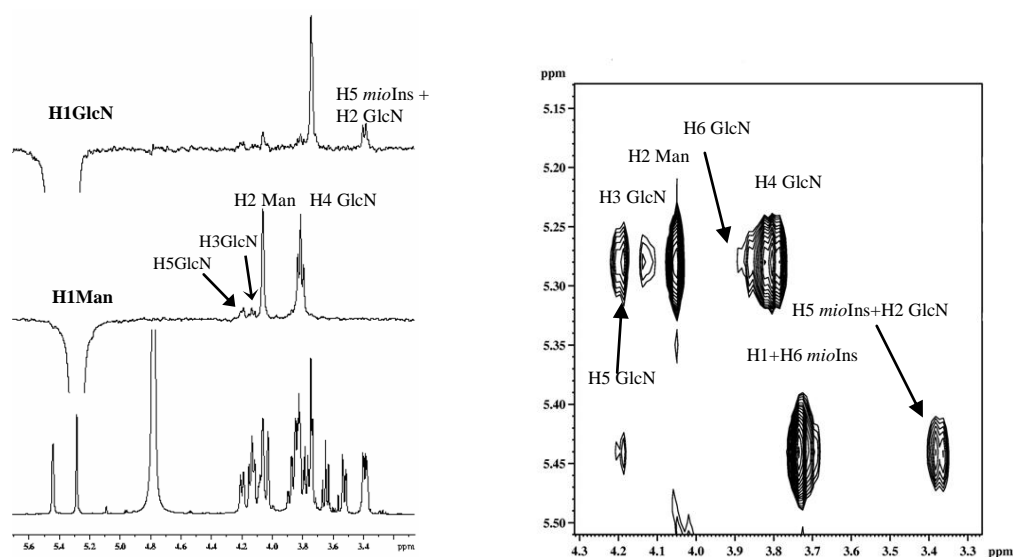


Figura 3.16. NOEs significativos de **25** a 500 MHz, pH 6,8 y 500 ms de tiempo de mezcla; 2D-NOESY (derecha) y 1D-dpfge-NOESY (izquierda).

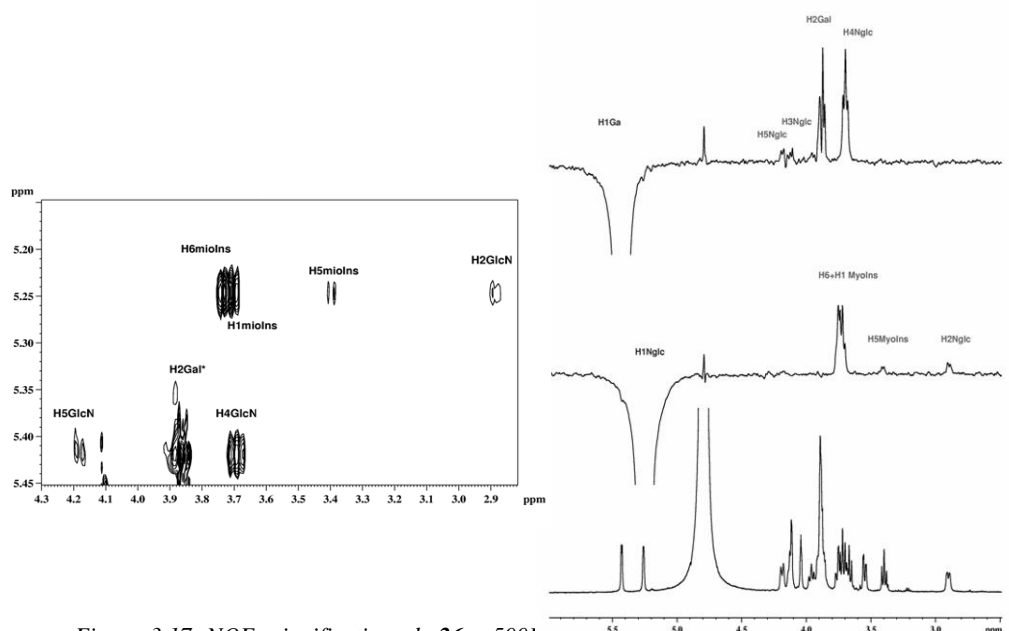
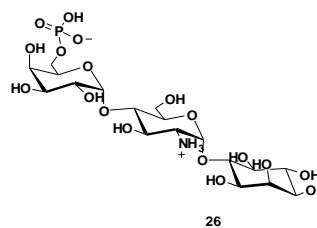
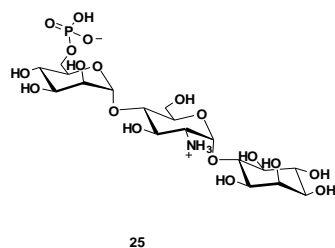


Figura 3.17. NOEs significativos de **26** a 500 MHz, pH 7,2 y 500 ms de tiempo de mezcla, 2D-NOESY (derecha) y 1D-dpfge-NOESY (izquierda).

Los experimentos NOESY empleados para el cálculo de las distancias interprotónicas de **26**, se realizaron a un pH de 9,2; diferente del de los experimentos de asignación para evitar el solapamiento de señales clave. Este hecho debe ser considerado en el análisis de los resultados puesto que indica la forma ácido-base predominante es la amino y que es diferente al amonio sobre la que se han realizado todos los estudios anteriores.

Cálculos teóricos de los trisacáridos 25 y 26.



Asumiendo el comportamiento monoconformacional de los monosacáridos caracterizado experimentalmente un análisis conformacional sistemático debería considerar a

los dos enlaces glicosídicos: hexosa-glucosamina y glucosamina-inositol y a los grupos exocíclicos, especialmente al ester fosfórico en la posición 6 del residuo del terminal no reductor. Al igual que se hizo para los trisacáridos **23** y **24**, no se consideraron relevantes los potenciales efectos de largo alcance, de manera que se asumió que las superficies de energía en función de los ángulos de torsión eran equivalentes en el trisacárido o en el disacárido. Por lo tanto, se analizaron las superficies de energía adiabáticas en función de los ángulos de torsión para 4-*O*-metil-glucosamina- $\alpha(1\rightarrow6)$ -*mio*-inositol (previamente calculado), 6-*O*-fosfatidilmanosa- $\alpha(1\rightarrow4)$ -1-*O*-metil-glucosamina y 6-*O*-fosfatidilgalactosa- $\alpha(1\rightarrow4)$ -1-*O*-metil-glucosamina.

Los mapas adiabáticos para los enlaces manosa-glucosamina y galactosa-glucosamina (figuras 3.18 y 3.19) se calcularon considerando los tres rotámeros posibles de los grupos hidroximetilo y un único conformero para el grupo fosfato¹ empleando AMBER* con la modificación de Senderowitz et al y el método de solvatación GB/SA.

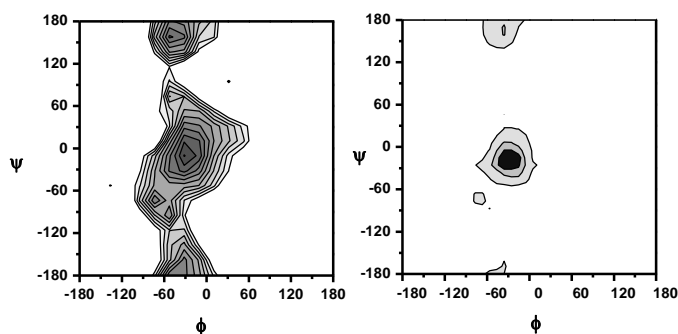


Figura 3.18. Mapas de energía adiabático (izda) y de distribución de probabilidad (derecha) para el disacárido 6-fosfato-*D*-manopiranosil- $\alpha(1\rightarrow4)$ -[2-amino-2-desoxi]-*D*-glucopiranosido.

¹ Con el fin de optimizar el número de estructuras a considerar en el cálculo de los mapas adiabáticos, se realizó un análisis previo de la estructura hidroximetilfosfato en manosa y galactosa para descartar aquellos rotámeros no probables. Los resultados de este análisis indicaron que mientras que son probables todos los conformeros gg, gt y tg el ángulo χ_1 presenta un único rotámero estable a 60°.

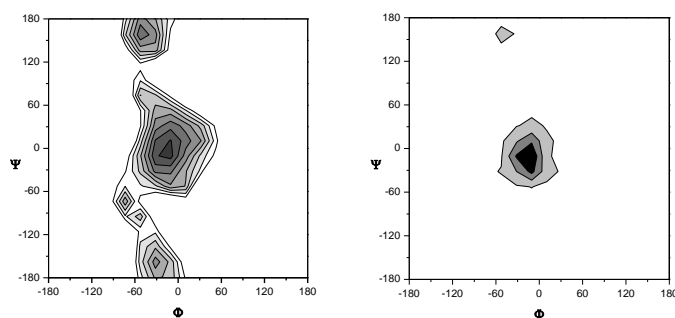


Figura 3.19. Mapas de energía adiabático (izda) y de distribución de probabilidad (derecha) para el disacárido 6-fosfato-D-galactopiranosil- $\alpha(1\rightarrow4)$ -[2-amino-2-desoxi]-D-glucopiranosido.

Los mapas adiabáticos calculados fueron semejantes para los dos tipos de enlace. En ambos casos se observa un mínimo absoluto de tipo *syn*- Ψ a valores Φ -18.0, Ψ -18.0 (para la unión Man- $\alpha(1\rightarrow4)$ -GlcN, compuesto **25**, figura 3.18) y a Φ -36.0, Ψ -18.0 para Gal- $\alpha(1\rightarrow4)$ -GlcN, compuesto **26**, figura 3.19) junto con un mínimo relativo tipo *anti*- Ψ a Φ -50, Ψ 160 y a Φ -36.0, Ψ 180.0 para **25** y **26** respectivamente.

Ambos tipos de conformeros fueron detectados experimentalmente por la observación de sus correspondientes NOE exclusivos (figura 3.16 y 3.17), véase apartado de RMN, por lo que cuantitativamente se puede concluir que al igual que **23** y **24** también la segunda unión glicosídica presenta un comportamiento apreciablemente flexible consistente con un equilibrio entre una disposición *syn*, mayoritaria, y otra *anti*, minoritaria. Para el análisis de la otra unión disacáridica, GlcN- $\alpha(1\rightarrow6)$ -*mio*-inositol, se emplearon los mapas adiabáticos obtenidos para los compuestos **7**, **23** y **24**. Los datos experimentales de RMN confirman cualitativamente estas predicciones observándose un patrón de NOEs exclusivos propio de la presencia simultánea de dos conformaciones *syn* y *anti* siendo mayoritaria la primera, como en los compuestos análogos **7**, **23** y **24**.

El estudio estructural de **25** y **26** fue ampliado con el análisis de su comportamiento dinámico mediante simulaciones de dinámica molecular estocástica (SD). Estos cálculos se realizaron de manera similar a la de los otros trisacáridos ya estudiados, **23** y **24**, empleando los parámetros específicos de Senderowitz et al para AMBER* y tanto $\epsilon=80$ como GB/SA para considerar los efectos del disolvente. Se prepararon dos estructuras de partida construidas a partir de los mapas adiabáticos, con el objeto de comprobar si en las condiciones de simulación

el sistema alcanzaba el equilibrio. Los resultados (figuras 3.20 y 3.21), obtenidos para las SD indican, en general, un acuerdo razonable con los resultados experimentales y las superficies energéticas calculadas.- Los dos enlaces glicosídicos oscilan principalmente alrededor de mínimos de tipo *syn*. Los resultados convergen independientemente de la estructura de partida, *syn*- Ψ_2 o *anti*- Ψ_2 , lo que indica que la duración de la simulación es suficiente como para alcanzar el estado estacionario. Al emplear el método GB/SA se mejora el comportamiento de las simulaciones al aumentar las transiciones hacia regiones anti especialmente en el caso del enlace glicosídico GlcN- $\alpha(1\rightarrow6)$ -*mio*-inositol. En cualquier caso, como se discutirá mas adelante la población de estas estructuras en el equilibrio esta infravalorada.

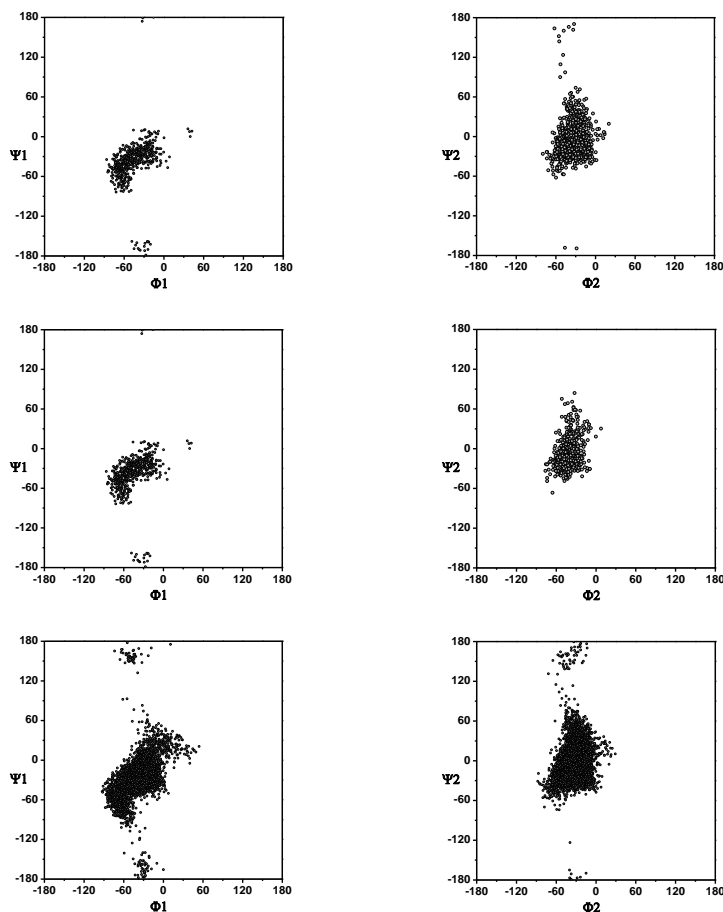


Figura 3.20. Distribución de los angulos de torsión Φ_1 , Ψ_1 , Φ_2 y Ψ_2 de **25** durante dinámicas estocásticas (60ns), partiendo de una conformación *syn*- Ψ_2 con $\varepsilon=80$ (superior) y GB/SA (centro) y de una conformación *anti*- Ψ_2 , GB/SA (inferior).

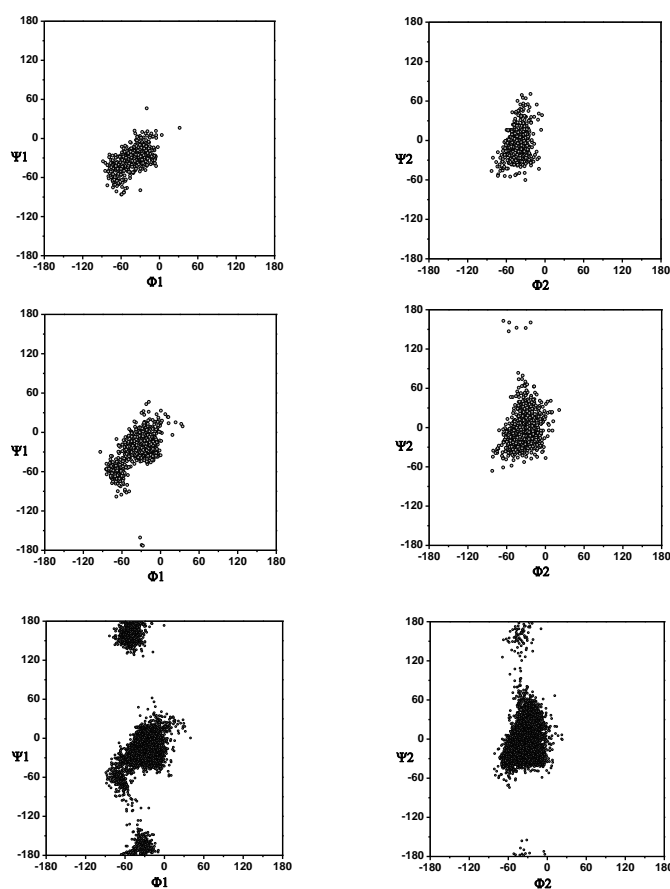


Figura 3.21. Distribución de los ángulos de torsión Φ_1 , Ψ_1 , Φ_2 y Ψ_2 de **26** durante dinámicas estocásticas (60ns), partiendo de una conformación *syn*- Ψ_2 con $\varepsilon=80$ (superior) y GB/SA (centro) y de una conformación *anti*- Ψ_2 y GB/SA (inferior).

El análisis cuantitativo de las simulaciones empleando las distancias interprotónicas experimentales presenta en este caso la dificultad de la escasez de restricciones de distancia debido a los problemas encontrados en la obtención de los datos experimentales. Este problema es especialmente acusado en el caso del trisacárido **25** para en que no se puede describir cuantitativamente el enlace glucosamina inositol. En líneas generales, las distancias correspondientes a los NOEs exclusivos de las conformaciones mayoritarias son más cortas que para los conformeros *anti*.

Tabla 3.9. Distancias interprotónicas teóricas calculadas como promedios $\langle r^6 \rangle$ para **25**, a partir de simulaciones de SD, y comparadas con las experimentales. Las comillas se refieren a los residuos de manosa ó galactosa (""); glucosamina ('); mio-inositol (sin comillas).

25	Exp. RMN	SD $\epsilon=80$ $\langle r^6 \rangle$	SD GB/SA $\langle r^6 \rangle$ <i>syn-Ψ</i>	SD GB/SA $\langle r^6 \rangle$ <i>anti-Ψ</i>
H1'-H6*	-	2,34	2,29	2,29
H1'-H5	no	4,35	4,14	4,05
H1''-H3'	3,5	3,09	3,07	3,37
H1''-H5'	3,4	3,63	3,27	3,97
H1''-H4'	2,3	2,54	2,46	2,41

Tabla 3.10. Distancias interprotónicas teóricas calculadas como promedios $\langle r^6 \rangle$ para **26**, a partir de simulaciones de SD, y comparadas con las experimentales. Las comillas se refieren a los residuos de manosa ó galactosa (""); glucosamina ('); mio-inositol (sin comillas).

26	Exp. RMN	SD $\epsilon=80$ $\langle r^6 \rangle$	SD GB/SA $\langle r^6 \rangle$ <i>syn-Ψ</i>	SD GB/SA $\langle r^6 \rangle$ <i>anti-Ψ</i>
H1'-H6*	2,2	2,35	2,28	2,29
H1'-H5	3,9	4,38	4,18	3,95
H1''-H3'	-	3,35	3,50	3,37
H1''-H5'	3,2	3,65	3,65	2,96
H1''-H4'	2,4	2,47	2,32	2,36

* Solapamiento de H1 y H6 de mio-inositol.

Los resultados reflejan un acuerdo razonable entre las distancias experimentales y las simulaciones partiendo de estructuras *syn-Ψ* que es mejor al emplear condiciones GB/SA para simular el efecto del disolvente. En el caso de las uniones GlcN - *myo*Ins se aprecia en el único caso cuantificado, compuesto **26**, una infravaloración de la población de las formas *anti* minoritarias.

Dinámicas Moleculares en agua explícita.

Con el propósito de intentar mejorar la descripción de las formas minoritarias *anti-Ψ*, se decidió elevar el nivel de teoría de las simulaciones de dinámica molecular con la inclusión de agua explícita en estos sistemas. El principal motivo de esta decisión fue la sensibilidad demostrada por estos compuestos a cambios en los modelos de solvatación empleados, ya que el empleo explícito de moléculas de agua supondría una evaluación más completa de las interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno entre el soluto y el disolvente.

En primer lugar fue necesario evaluar las cargas puntuales para estos compuestos. Se siguieron los procedimientos habituales,⁵⁰ y se empleó el método RESP (*Restrained ElectroStatic Potencial fit*).²⁴ Para ello, primero se realizó el cálculo mediante mecánica

cuántica de las estructuras optimizadas de cada compuesto estudiado, empleando GAUSSIAN 94⁵¹ y/o 98⁵², con la base 6-31G*. Posteriormente el método RESP permitió asignar las densidades electrónicas a cargas puntuales adecuadas para los cálculos posteriores. Los compuestos analizados para el cálculo de cargas fueron el trisacárido **25**, el anillo de *D-mio*-inositol, *D-qui*ro-inositol, 6-metil- α -*D-mio*-inositol y el 6-metil- α -*D-qui*ro-inositol, que quedan representados en la figura 3.22. Los datos de cargas obtenidos quedan reflejados en el capítulo 4 (parte experimental) de la presente tesis doctoral.

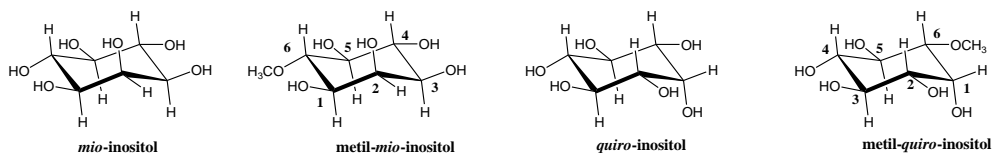


Figura 3.22. Representación de los anillos de ciclitol, libres y metilados que junto al compuesto **25** constituyen los modelos para el cálculo de las cargas RESP. Se muestra la numeración de los anillos en los compuestos metilados.

Para estas simulaciones se empleó un protocolo de equilibración consistente una secuencia de minimizaciones energéticas con restricciones posicionales en los átomos del soluto, seguidas de dinámicas cortas a presión constante para equilibrar la densidad del sistema (ver parte experimental). Finalmente se realizó la dinámica molecular “productiva” de la que, tras un período inicial, es posible extraer información estructural. Tras esta equilibración, la dinámica “productiva” de **22** (10 ns) se llevó a cabo en el colectivo NTP (P=cte), a una temperatura de 300 K (figura 3.23).

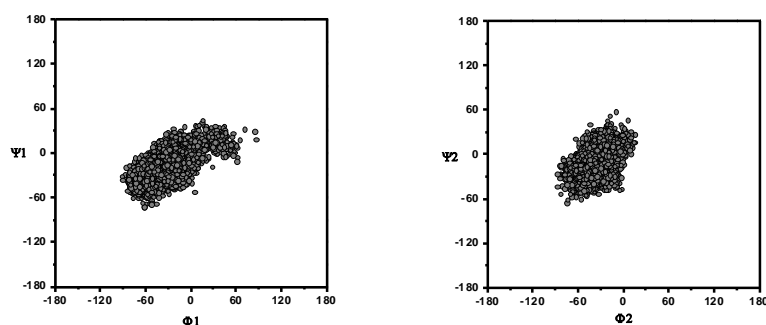


Figura 3.23. Mapas de trayectorias Φ, Ψ , para la dinámica molecular de **25** con la inclusión de agua explícita.

El espacio conformacional accesible en las torsiones glicosídicas recorrido a lo largo de las trayectorias (Figura 3.23), es similar al encontrado en las simulaciones que emplearon el método GB/SA. Las dos uniones mostraron un comportamiento similar registrándose oscilaciones alrededor de disposiciones tipo *syn*- Ψ y no se observaron transiciones a geometrías *anti* (Figura 3.24). Como cabe esperar de estos resultados, las distancias interprotónicas calculadas a partir de las trayectorias (Tabla 3.11) adolecen del mismo problema que las anteriores, la subestimación de las distancias correspondientes al mínimo menos poblado. Por el contrario aquellas distancias características de los mínimos *syn*- Ψ están en acuerdo con las experimentales.

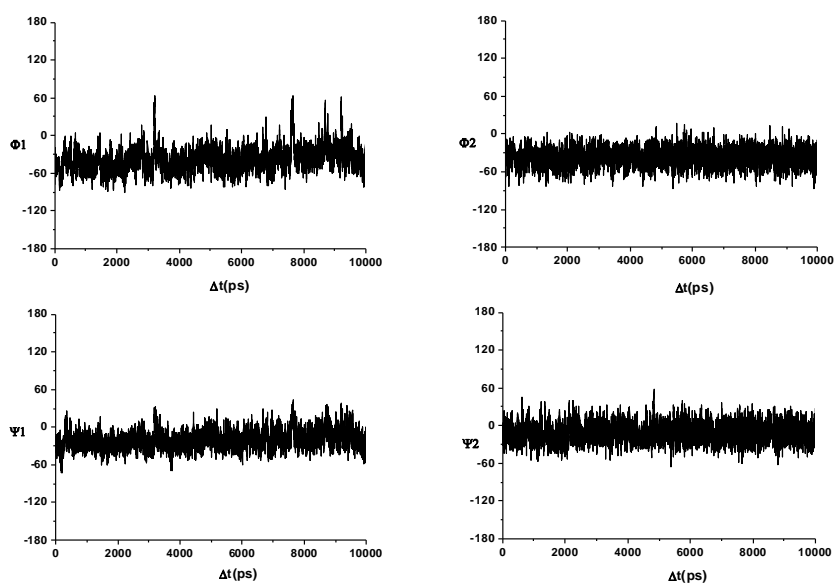


Figura 3.24. Trayectorias de los ángulos glicosídicos Φ, Ψ para la simulación de dinámica molecular de 25.

Tabla 3.11. Distancias interprotónicas teóricas calculadas como promedios $\langle r^6 \rangle$ para **25**, a partir de simulaciones de dinámicas moleculares y comparadas con las experimentales. Las comillas se refieren a los residuos de manosa (""); glucosamina (') y mio-inositol (sin comillas).

25	Experimental RMN	SD $\epsilon=80$ $\langle r^6 \rangle$	SD GB/SA $\langle r^6 \rangle$ <i>syn-Ψ_2</i>	DM Agua-explicita $\langle r^6 \rangle$
H1"-H6	-	2,34	2,29	2,37
H1"-H5	no	4,35	4,14	4,47
H1"-H3'	3,48	3,09	3,07	3,77
H1"-H5'	3,39	3,63	3,27	4,45
H1"-H4'	2,30	2,54	2,46	2,45

El elevado coste computacional que conlleva el realizar las simulaciones con agua explícita frente a las dinámicas con agua implícita (SD con GB/SA), junto con la escasa mejora en la calidad de la información estructural que aportan, llevaron a nuestro grupo a descartar el empleo de simulaciones de dinámica molecular en agua explícita en el estudio de los nuevos compuestos.

3.3.4.- PSEUDOTRISACÁRIDO DI-FOSFATO.

Estudios por RMN del trisacárido 27.

En este caso, el valor de pH óptimo para el estudio de **27** fue 5,9, probablemente debido a que este compuesto posee dos grupos fosfato y uno amina. En estas condiciones se minimiza el solapamiento de señales al mismo tiempo que se evitan los rangos próximos a los pKa de los grupos ionizables. Los resultados de la asignación en estas condiciones se muestran en la tabla 3.12.

Tabla 3.12. Desplazamientos químicos δ (ppm) de ^1H y ^{13}C y valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ (Hz), para **27** en D_2O , a 500 MHz y 298 K.

	27 δ (^1H)	$^3J_{\text{H-H}}$		27 δ (^{13}C)
Galactosa				
H-1	5,47	3,9	C-1	98,8
H-2	3,85	3,8/ 10,4	C-2	68,6
H-3	3,91	3,3/10,5	C-3	69,1
H-4	4,05	-	C-4	69,0
H-5	4,21	-/ 6,3	C-5	70,6
H6a/H6b	3,97	-	C-6	64,2
	3,97			
Glucosamina				
H-1	5,42	3,4	C-1	96,3
H-2	3,42	3,7/10,3	C-2	54,4
H-3	4,34	10,4/ 11,2	C-3	69,9
H-4	3,84	9,8/ 10,2	C-4	75,5
H-5	4,43	3,1/ 10,2	C-5	69,7
H6a/H6b	4,14	-	C-6	64,6
	4,14	-		
mio-inositol				
H-1	3,75	-	C-1	71,7
H-2	4,00	2,5	C-2	72,5
H-3	3,53	2,8/ 10,0	C-3	71,1
H-4	3,66	9,8	C-4	72,7
H-5	3,39	-	C-5	72,8
H-6	3,74	-	C-6	80,9

Los valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H1-H2}}$, $^3J_{\text{H2-H3}}$, $^3J_{\text{H3-H4}}$, y $^3J_{\text{H4-H5}}$, observadas para los trisacáridos se encuentran próximos a los valores esperados para conformaciones $^4\text{C}_1$ en aldohexopiranosas.⁴

En relación con la orientación de los enlaces glicosídicos y la estructura tridimensional global de **27** no se pudo realizar el análisis directo de todos los picos NOE debido a la coincidencia accidental de desplazamientos químicos de varios protones. Finalmente, fue posible la identificación inambigua de todos los picos NOE realizando los experimentos NOESY a diferentes valores de pH. Los resultados de estos experimentos indicaron un comportamiento conformacional muy similar al experimentado por el resto de los trisacáridos **23-26**. Se observó, para ambos enlaces glicosídicos, la coexistencia de dos patrones de señales característicos de dos conformaciones, *syn*- Ψ y *anti*- Ψ , siendo el primer conjunto el de mayor intensidad relativa. Para la unión Gal- α (1 \rightarrow 6)GlcN se detectaron los picos de cruce (H1''-H4'), exclusivo de la conformación *syn*- Ψ junto con H1''-H5' y

H1''-H3' característicos de *anti*- Ψ . En el caso de la unión GlcN-*mio*-inositol, se observaron los picos característicos de este motivo entre H1' y H6, H1 y H5 (figura 3.25).

Por lo tanto, se puede concluir cualitativamente que este trisacárido presenta un comportamiento marcado por una alta flexibilidad al presentar un equilibrio conformacional entre disposiciones de los enlaces glicosídicos tipo *syn*- Ψ y *anti*- Ψ , siendo estas últimas las minoritarias. Al igual que con el resto de los compuestos se realizó un análisis cuantitativo de las distancias interprotónicas clave a partir de las velocidades de relajación cruzada estimadas de la dependencia de la intensidad de los picos NOE con el tiempo de mezcla. Estos resultados se comentan en mayor detalle junto con los resultados del apartado de modelado molecular.

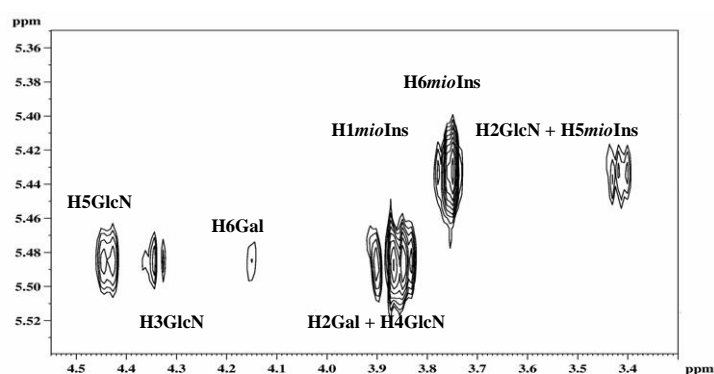


Figura 3.25. Ampliación del espectro 2D-NOESY de **27**, en D_2O , 25°C y 500 MHz, a un τ_m de 600 ms.

Cálculos teóricos para el trisacárido **27**.

Para los estudios teóricos que realizamos con el compuesto **27**, se partía con la ventaja de conocer previamente el comportamiento de las uniones Gal→GlcN y GlcN→*mio*-inositol. Estas uniones han sido debidamente analizadas a lo largo de la presente tesis en los compuestos **7**, y **23-26**. También se realizaron (figura 3.26) búsquedas sistemáticas de los ángulos de torsión ω_1 y ω_2 , con el fin de disponer de datos suficientes de las regiones mínima energía que definen las preferencias conformacionales de los grupos exocíclicos, que soportan a los grupos fosfato (figura 3.26) para la optimización de las estructuras de partida.

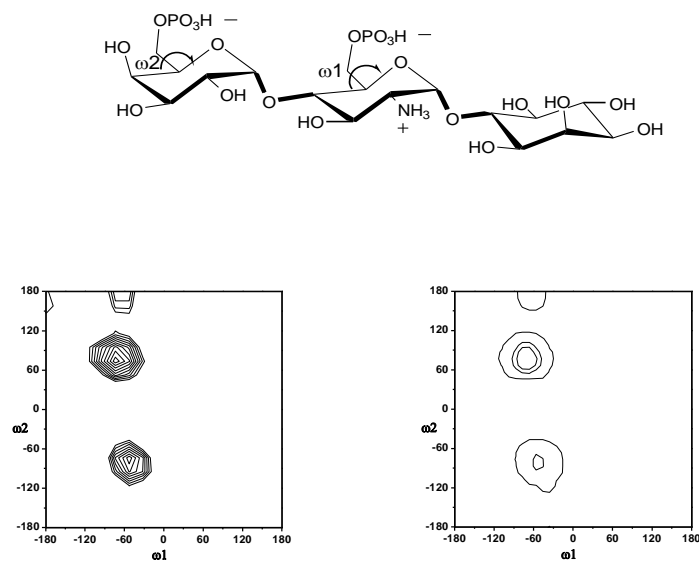


Figura 3.26. Mapas de energía y de distribución de probabilidad para la unión 6P-Gal \rightarrow 6P-GlcN de 27, obtenido con campo de fuerzas AMBER*, parametrización Senderowitz et al. y método GB/SA, tras simulación de búsqueda conformacional en los ángulos de torsión ω_1 y ω_2 .

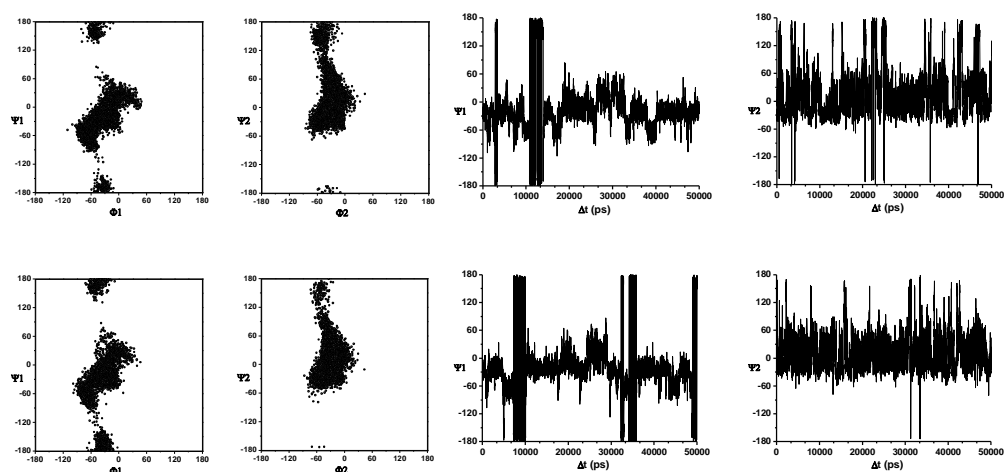


Figura 3.27. Simulaciones de dinámicas estocásticas (50ns) para el compuesto 27, para el campo de fuerzas AMBER*, parametrización de Senderowitz et al. y método GB/SA, partiendo desde el mínimo syn- Ψ (superior) y desde el anti- Ψ (inferior).

En este caso el análisis de las trayectorias de SD partiendo de mínimos tipo *syn*- o *anti*- Ψ muestran un apreciable nivel de conversión conformacional en ambos (Figura 3.27). La población de las formas *anti* fue superior al 5% para ambos enlaces cualquiera que fuese la estructura de partida. Las distancias interprotónicas teóricas (tabla 2.13), calculadas como promedio en $\langle r^{-6} \rangle$ a lo largo de dinámicas estocásticas reflejan un buen acuerdo con las experimentales.

Tabla 3.12. Distancias interprotónicas teóricas calculadas como promedios $\langle r^{-6} \rangle$ para **27**, a partir de simulaciones de SD, y comparadas con las experimentales. Las comillas se refieren a los residuos de manosa ó galactosa (""); glucosamina ('); mio-inositol (sin comillas).

27	Exp.	SD $\langle r^{-6} \rangle$ <i>syn</i>-Ψ	SD $\langle r^{-6} \rangle$ <i>anti</i>-Ψ
H1'-H6*	2,2*	2,35	2,30
H1'-H5	Solap.	3,83	3,77
H1'-H1	3,7	3,30	3,92
H1''-H3'	3,4	3,33	3,13
H1''-H5'	3,1	3,31	3,08
H1''-H4'	2,5	2,39	2,43

* Solapamiento de H1 y H6 de mio-inositol.

Destaca de los datos calculados a partir de las simulaciones de SD el excelente ajuste para las distancias correspondientes a la unión Gal- α (1 \rightarrow 4)-GlcN, incluso para aquellas que caracterizan al mínimo *anti*- Ψ . Desafortunadamente no se pudo calcular experimentalmente la distancia H1'-H5 para la unión GlcN- α (1 \rightarrow 6)-mio-inositol, para poder realizar una comparación similar.

3.4.- ESTUDIO DE PROTONES HIDROXÍLICOS POR RMN.

Un factor determinante de la precisión con la que es posible definir estructuras tridimensionales basadas en RMN es el número de restricciones experimentales significativas accesibles.⁵³ Esta es la principal causa de la diferencia en la definición de estructuras obtenidas mediante RMN para proteínas, con un gran número de NOEs, frente a las de carbohidratos, peor definidas. En el caso de carbohidratos, debido a su propia naturaleza, sólo es posible observar un número limitado de NOEs estructuralmente relevantes en disoluciones de $^2\text{H}_2\text{O}$. Como consecuencia de este inconveniente, la precisión y resolución con la que es posible realizar la determinación estructural de carbohidratos ha sido menos satisfactoria que en el caso de otras biomoléculas. Este hecho ha estimulado la búsqueda de métodos alternativos de obtención de restricciones complementarias al NOE, como son las constantes de acoplamiento escalar o dipolar residual.⁵⁴ Otra estrategia se ha basado en ampliar el conjunto de restricciones derivadas de NOEs a los protones hidroxílicos para obtener más restricciones significativas.

Así la estudio de los protones hidroxílicos ha sido empleado para obtener información estructural en términos de estereoquímica⁵⁵, distancias interprotónicas^{56,57}, enlaces de hidrógeno⁵⁸, etc.

Requisitos para la observación de los hidroxilos en agua:

El primer requisito es obviamente realizar los experimentos en H₂O para evitar el intercambio de los protones lábiles con los deuterones del disolvente habitualmente empleado. En estas condiciones es necesario observar las señales del soluto (~1mM) en presencia de las de H₂O (~50M). Esta relación sobrepasa el rango dinámico de los ADCs empleados en RMN, lo que implica usar algún tipo de supresión de señal del disolvente para observar las del soluto, como por ejemplo, presaturación⁵⁹, Jump-Return⁶⁰, NOHOSS⁶¹, 1-1 Echo⁶², Spin-Lock⁶³ o empleando gradientes de campo, watergate⁶⁴ o excitation sculpting⁶⁵. Por otro lado, el esquema empleado para eliminar la señal debe ser más rápido que la velocidad de intercambio entre los protones lábiles y el disolvente para evitar destruir las señales de interés. Este es el inconveniente de la presaturación, que es el método más común para suprimir la señal del disolvente. Durante el proceso de saturación los protones lábiles se intercambian con los del disolvente magnéticamente inactivos, produciendo la pérdida de las señales de interés. El módulo Watergate (Water Supresion by Gradient Tailored Excitation), utiliza una combinación de pulsos de radiofrecuencia selectivos y pulsos de gradientes para conseguir una supresión de agua del rango necesario (10^4 - 10^5) y es suficientemente rápido como para permitir la observación de señales con velocidades de intercambio relativamente altas. Además, es sencillo de adaptar a la mayoría de experimentos de RMN. Estas características le han convertido en la técnica de elección para la supresión de disolventes cuando se desea observar señales de protones intercambiabiles con el agua.⁶⁶

Los protones hidroxílicos tienen velocidades intrínsecas de intercambio con el agua mucho mayores que otros protones intercambiabiles, como los protones de amida de las proteínas. Por ello la observación de las señales de los grupos hidroxilo de carbohidratos es mucho más difícil. Su éxito depende en gran medida de la disminución de la cinética del intercambio en la muestra. Para ello se disminuye la temperatura lo máximo posible, incluso empleando mezclas crioscópicas como H₂O / Acetona o Metanol 9:1 que congela entre -10 a -15° C⁶⁷ o DMSO_{d6}: H₂O 1:3 (v/v) que congela a - 62° C⁶⁸ o métodos de agua superenfriada.⁶⁹ Como el mecanismo de intercambio presenta un mecanismo de catálisis acido-base general, también es de vital importancia el ajuste del pH de la muestra en torno a la neutralidad con el fin de minimizar este intercambio.⁷⁰ Finalmente, es igualmente importante limitar la presencia de trazas iónicas que de la misma manera actúan como catalizadores del proceso.⁷¹

Resultado con los pseudooligosacáridos 25 y 26.

Con el fin de optimizar las condiciones experimentales, preparación de la muestra, optimización de las secuencias de pulsos, etc, se eligió como compuesto modelo la sacarosa que ha sido frecuente objeto de este tipo de estudios.

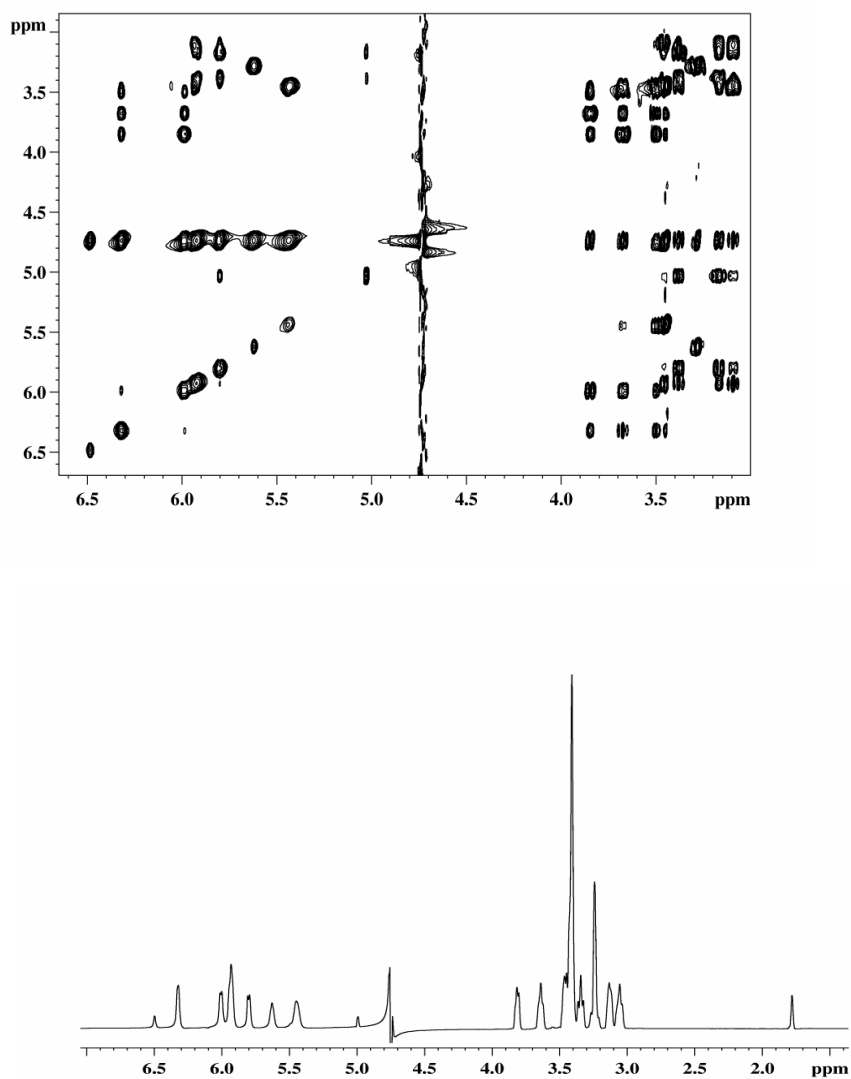


Figura 3.28. Espectros de RMN para una muestra de sacarosa en $\text{H}_2\text{O}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, en proporción 85% / 15%, 20mM realizado a -7°C y pH 6.75; en la parte superior se muestra el espectro de TOCSY, a τ de 40ms, en la inferior el espectro $1\text{D } ^1\text{H}$ ambos con módulo WATERGATE.

Los experimentos se realizaron con una muestra de sacarosa y utilizando condiciones establecidas por estudios precedentes: pH próximo a la neutralidad (6,75), temperaturas por debajo de -7°C empleando una mezcla agua y acetona y el módulo de supresión de agua tipo Watergate, con el tren de pulsos 3-9-19. Los resultados fueron buenos pudiendo realizar experimentos bidimensionales (TOCSY y NOESY) y fue posible realizar una completa asignación de las resonancias de los hidroxilos (figura 3.28). También se pudo establecer que la influencia de la concentración es apreciable aunque no trascendental realizando los experimentos a concentraciones entre 2 y 20mM.

A continuación realizamos los experimentos para detectar los hidroxilos de los trisacáridos **25** y **26**. Después de varios ensayos se determinó que en nuestro caso, la mezcla de disolventes óptima fue agua / acetona 85:15, lo que permitió alcanzar temperaturas de -17°C para una concentración de azúcar del orden de 10mM. En primer lugar, se realizó una evaluación detallada de la influencia del pH en las señales de los hidroxilos (Figura 3.29). Tal y como se esperaba, los pH próximos a la neutralidad, son los más apropiados para la observación de estas señales, siendo los óptimos: 7,17 para **25** y de 7,12 para **26**. A valores por debajo de pH 5,0 y por encima de 8,0 se observa un ensanchamiento notable de las señales, como consecuencia de la aceleración de procesos de intercambio químico.

Otro de los factores que influye en el aspecto de los espectros, concretamente en la forma de los protones lábiles intercambiables, es la temperatura. Por un lado su disminución favorece la observación de las señales al disminuir la velocidad del intercambio químico con el agua, por otro su influencia en la movilidad del soluto y viscosidad del disolvente a temperaturas próximas a la congelación produce un ensanchamiento generalizado de las señales. Aunque se había descrito la utilización de resinas de intercambio iónico^{72,71e} para eliminar posibles trazas de las impurezas iónicas que catalizan el intercambio, en nuestro caso debido a la presencia de grupos cargados fosfato y amino en los pseudotrisacaridos **25** y **26** esto no fue posible. Por ello, se efectuó la purificación previa empleando cromatografía en fase reversa.

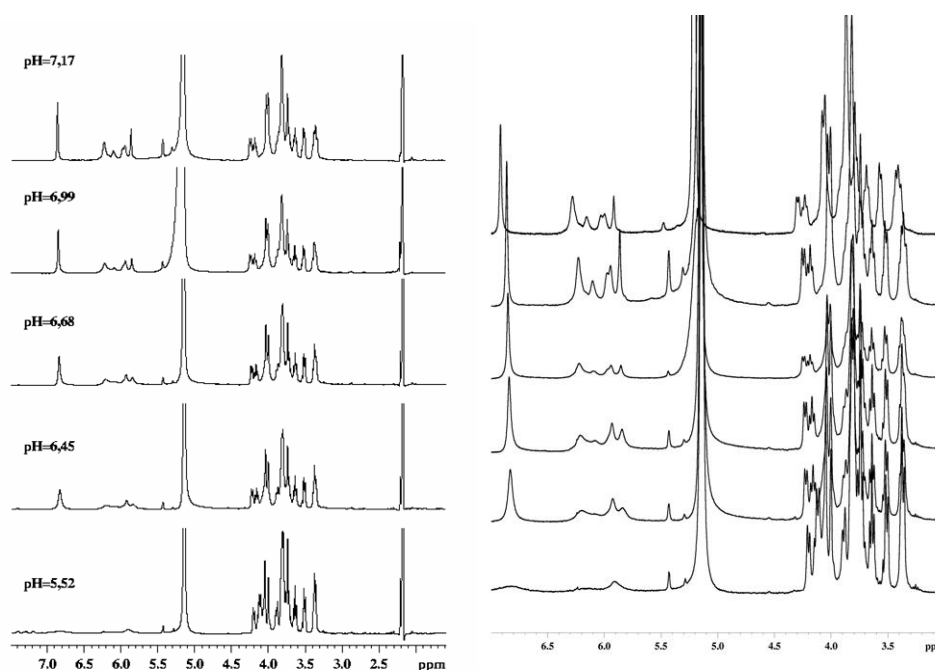


Figura 3.29. Espectros de RMN para una muestra de **25** (izda) en $H_2O/(CD_3)_2CO$, en proporción 85%:15%, realizado a $-7^\circ C$ y 500 MHz y variando el pH para observar el rango óptimo de observación de las señales de hidroxilo (desapantalladas) y de **26** (drcha) con variaciones de la temperatura desde 273K (inferior) hasta 262 K (superior) para un pH óptimo fijo de 7,12.

Finalmente, las condiciones óptimas encontradas para la de preparación de las muestras fueron: el empleo de agua y acetona (85:15) como disolvente, a pH de 7,17 para **22** y de 7,12 para **23** y una temperatura entre $0^\circ C$ hasta $-15^\circ C$.

La asignación de las señales de los protones hidroxílicos se realizó mediante experimentos TOCSY realizados a diferentes tiempos de mezcla (15-60 ms) y experimentos NOESY y ROESY todos ellos empleando el módulo watergate (figura 3.30). Se pudieron detectar e identificar las señales correspondientes al residuo del ciclitol (*mio*-inositol), no identificándose las correspondientes a los otros anillos de piranosa (ver figura 3.31). La señal más desapantallada y estrecha del espectro se corresponde con los protones del grupo amino, en posición 2 de los residuos de glucosa.

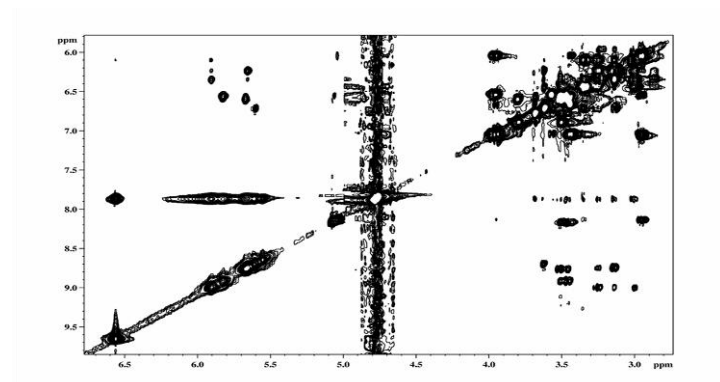


Figura 3.30. Espectros TOCSY con módulo WATERGATE a τ_n de 40 ms para una muestra de **26** en $H_2O/(CD_3)_2CO$, a $-11^\circ C$ y 500MHz y realizados a pH óptimo de 7,17.

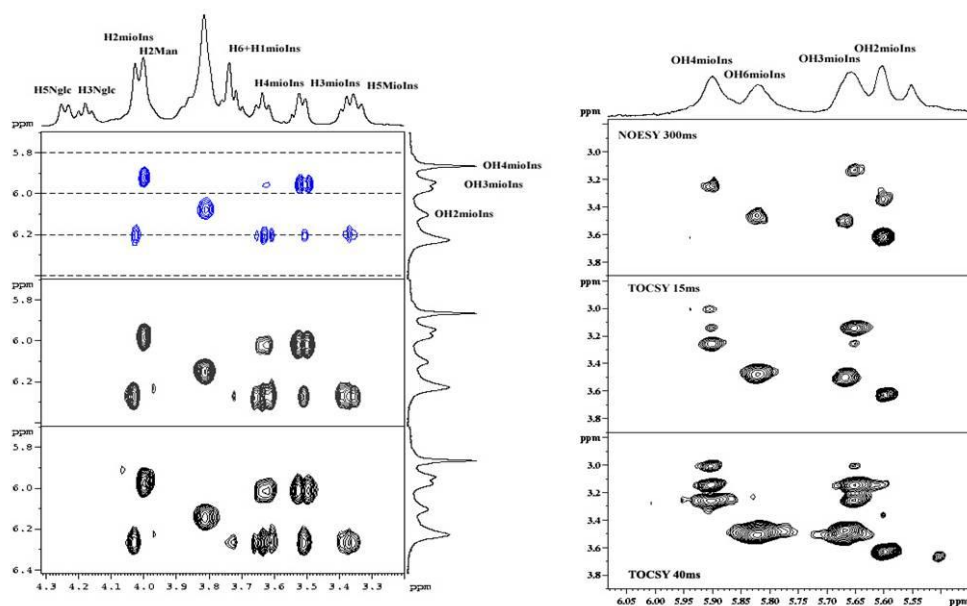


Figura 3.31. Ampliación de los espectros TOCSY con módulo WATERGATE a τ_n de 15 ms (centro) y 40 ms (abajo) para una muestra de **25** (izda) y **26** (derecha) en $H_2O/(CD_3)_2CO$, a $-11^\circ C$ y 500MHz y realizados a sus pH óptimos. El diagrama superior derecho muestra una ampliación del 2D-NOESY para **26** con WATERGATE a 300 ms.

En cualquier caso y a pesar de haber conseguido observar y asignar las señales de algunos hidroxilos, no se pudo extraer información estructuralmente relevante como constantes de acoplamiento o NOEs interglucosídicos. En nuestras manos y para estos compuestos no fue posible reducir suficientemente las velocidades de intercambio con el disolvente y las señales observadas eran aun demasiado anchas como para poder medir las

constantes de acoplamiento. El mismo intercambio químico domina los experimentos NOESY y ROESY de forma tal que no permite obtener picos NOE de valor estructural debido a que las transferencias secuenciales generan un alto número de permutaciones. Una posible explicación para la diferencia de comportamiento de **25** y **26** con la sacarosa empleando el mismo sistema, equipo y laboratorio, podría residir en la influencia de los grupos ionizados presentes en los pseudotrisacaridos como autocatalizadores de los procesos de intercambio con el disolvente. Como consecuencia de los estos resultados se decidió no continuar el estudio con el resto de los compuestos.

3.5.- DISCUSIÓN

Se ha llevado a cabo el estudio estructural en disolución de las estructuras pseudodisacáridicas **20-22**, y pseudotrisacáridicas **23-27**, mediante la combinación de RMN y métodos de cálculo teóricos: MM y dinámicas moleculares estocásticas. Los estudios se han realizado con el campo de fuerzas AMBER* y parametrizaciones de Senderowitz-Parish-Still, de manera similar a la presentada en el capítulo 2 de esta tesis doctoral.

Respecto a los compuestos **20-22**, caracterizados por poseer grupos fosfato en los anillos de GlcN, se ha comprobado experimentalmente (a través de NOEs exclusivos) que existen en disolución como un equilibrio entre dos conformeros: uno mayoritario *syn*- Ψ , y otro minoritario del tipo *anti*- Ψ . Con el objeto de poder realizar un estudio comparativo del efecto de la sustitución del grupo fosfato, en las simulaciones teóricas se realizó la comparación con el compuesto base **7** (que no posee grupo fosfato). Las trayectorias de las dinámicas estocásticas (SD) de los compuestos **20-22**, visitaron las regiones *anti*- Ψ , mientras esto no sucedió para **7**. La comparación entre las distancias promedio a lo largo de las trayectorias y las experimentales, fueron buenos para la distancia que caracteriza al mínimo más poblado *syn*- Ψ , mientras que las correspondientes a la contribución de conformeros *anti*- Ψ , fueron en general, sobreestimadas en todos los casos.

El estudio de los pseudotrisacáridos **23-27** requirió analizar separadamente las dos uniones glicosídicas, a saber, Hexosa- α (1 \rightarrow 4)-GlcN y GlcN- α (1 \rightarrow 6)-*mio*-inositol. Con respecto al enlace GlcN- α (1 \rightarrow 6)-*mio*-inositol para **23**, **24**, **25**, **26** y **27**, la observación simultánea de NOE exclusivos de las conformaciones *syn*- Ψ y *anti*- Ψ , incompatibles entre sí, indicó que para este enlace debe existir un equilibrio conformacional entre ambas situaciones. La mayor intensidad de los mínimos *syn*- Ψ , frente a los *anti*- Ψ , nos señala la menor distancia de los primeros. Respecto al otro enlace glicosídico, hexosa- α (1 \rightarrow 4)-GlcN, ocurre algo

similar; todos los compuestos presentan un equilibrio conformacional entre un mínimo *anti-Ψ* minoritario y otro *syn-Ψ* mayoritario.

Los mapas de energía adiabáticos y mapas de distribución de probabilidad conformacional calculados concuerdan aceptablemente con las distancias experimentales para la unión Hexosa- $\alpha(1\rightarrow4)$ -GlcN de los compuestos **23-27**. Así se predicen los mínimos *syn-Ψ* y los *anti-Ψ* que antes habían sido detectados experimentalmente por RMN, validando esta metodología empleada. Respecto a la unión GlcN- $\alpha(1\rightarrow6)$ -*mio*-inositol, que ya había sido analizada en el capítulo 2, el modelo empleado no predice los mínimos *anti-Ψ*.

La metodología de dinámicas estocásticas fue empleada a continuación con dos tratamientos del disolvente implícito diferentes: $\epsilon=80$ y GB/SA, con el objeto de comprobar cuál reproducía con mayor fiabilidad los datos experimentales hallados mediante los experimentos de RMN. De manera general se puede decir que el empleo de SD mejoró los ajustes entre las distancias experimentales y las teóricas calculadas como promedio de las estructuras en las simulaciones, con respecto a las simulaciones de MM. En ambas uniones glicosídicas, las distancias relativas a conformaciones *syn-Ψ*, fueron mejor reproducidas por las simulaciones, especialmente al emplear el método de GB/SA. Por otro lado, las distancias *anti-Ψ* fueron sistemáticamente sobreestimadas independientemente de las condiciones utilizadas.

Es destacable el caso del compuesto **27**, en donde el ajuste experimentado en las distancias que caracterizaban los dos mínimos conformacionales *syn-Ψ*/*anti-Ψ*, entre los experimentos de RMN y las simulaciones de SD, fue casi perfecto para ambas uniones glicosídicas.

Con los objetivos propuestos en el apartado 3.3.4 del presente capítulo, se realizaron experimentos con H₂O como disolvente, a bajas temperaturas y utilizando los métodos actuales para supresión de disolventes mediante técnicas de RMN (secuencias de watergate), en los compuestos **25** y **26**. A pesar del enorme esfuerzo empleado para la detección de los OH- de estos compuestos en H₂O, apenas algunos hidroxilos de los residuos de *mio*-inositol pudieron ser claramente detectados, mientras que aquéllos de los residuos de hexosa y de glucosamina permanecieron ocultos. Puesto que empleando como modelo sacarosa pudimos detectar satisfactoriamente los hidroxilos utilizando las mismas condiciones que con **25** y **26** (campo magnético, temperatura, etc.) se puede concluir que la naturaleza intrínseca de estos potenciales mediadores de IPGs (más concretamente, la presencia de los grupos fosfato y amonio) es la que impide la plena observación de los hidroxilos en H₂O.

También se ha evaluado el uso de disolvente explícito en los estudios de modelado molecular empleando el compuesto **25** como modelo. El cálculo de cargas atómicas válidas

para este compuesto **25** y extrapolables a los demás, hizo que se empezara por el residuo de ciclitol (*mio*- y *quiro*-inositol común en todas los compuestos), tanto en sus versiones libre como metilados en posición 6. Nos hemos concentrado en los métodos de cargas basadas en el potencial electrostático (RESP) y nuestro criterio de calidad clave fue el cálculo de las energías de interacción electrostática total de las simulaciones.

Tras el cálculo específico de las cargas basadas en el potencial electrostático, las dificultades en estas simulaciones empezaron con la equilibración del sistema, tras incluir el soluto **25** en la caja rectangular de agua (TIP3P), donde se producían continuos errores debidos al reescalado de las velocidades atómicas. Tras superar estos problemas, la dinámica productiva (10 ns en aproximadamente 6 meses de simulación) tampoco mejoró la descripción del equilibrio observado experimentalmente entre los mínimos *syn*- Ψ y *anti*- Ψ . Por esto y a falta de datos que inviertan esta opinión, no parece demasiado adecuado emplear esta metodología en el estudio de pseudooligosacáridos mediadores de IPGs, dado la elevada exigencia requerida en coste computacional y los resultados obtenidos.

3.6.- BIBLIOGRAFIA

- ¹ Jones, D.R.; Varela-Nieto, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1998, 30, (3), 313-326.
- ² Field, M. C. *Glycobiology*. **1997**, 7, (2), 161-168.
- ³ Stralfors, P. *Bioessays*. **1997**, 19, (4), 327-335.
- ⁴ Cohen, P. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2002**, 1, (4), 309-315.
- ⁵ Knighton, D.R.; Zheng, J.H.; Teneyck, L.F.; Ashford, V.A.; Xuong, N.H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Science* **1991**, 253, (5018), 407-414.
- ⁶ Knighton, D.R.; Zheng, J.H.; Teneyck, L.F.; Xuong, N.H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J. M. *Science* **1991**, 253, (5018), 414-420.
- ⁷ Zheng, J.H.; Knighton, D.R.; Parello, J.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Methods in Enzymology* **1991**, 200, 508-521.
- ⁸ Knighton, D.R.; Bell, S.M.; Zheng, J.H.; Teneyck, L.F.; Xuong, N.H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. **1993**, 49, 357-361.
- ⁹ Zheng, J.H.; Knighton, D.R.; Teneyck, L. F.; Karlsson, R.; Xuong, N.H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Biochemistry*. **1993**, 32, (9), 2154-2161.
- ¹⁰ Zheng, J.H.; Knighton, D.R.; Xuong, N.H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M.; Teneyck, L.F. *Protein Science*. **1993**, 2, (10), 1559-1573.
- ¹¹ Zheng, J.H.; Trafny, E.A.; Knighton, D.R.; Xuong, N. .; Taylor, S.S.; Teneyck, L.F.; Sowadski, J.M. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. **1993**, 49, 362-365.
- ¹² Madhusudan; E.A.;Trafny, E.A.; Xuong, N.H.; Adams, J.A.; Teneyck, L.F.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Protein Science*. **1994**, 3, (2), 176-187.
- ¹³ Karlsson, R.; Zheng, J.H.; Xuong, N.H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. **1993**, 49, 381-388.
- ¹⁴ Gassel, M.; Breitenlechner, C.B.; Konig, N.; Huber, R.; Engh, R.A.; Bossemeyer, D. *Journal of Biological Chemistry*. **2004**, 279, (22), 23679-23690.
- ¹⁵ Prade, L.; Engh, R.A.; Girod, A.; Kinzel, V.; Huber, R.; Bossemeyer, D. *Structure*. **1997**, 5, (12), 1627-1637.
- ¹⁶ Engh, R.A.; Girod, A.; Kinzel, V.; Huber, R.; Bossemeyer, D. *Journal of Biological Chemistry*. **1996**, 271, (42), 26157-26164.
- ¹⁷ Bossemeyer, D.; Engh, R.A.; Kinzel, V.; Ponstingl, H.; Huber, R. *Embo Journal*. **1993**, 12, (3), 849-859.
- ¹⁸ Toledo, L.M.; Lydon, N.B.; Elbaum, D. *Current Medicinal Chemistry*. **1999**, 6, (9), 775-805.

- ¹⁹ Toledo, L.M.; Lydon, N.B. *Structure*. **1997**, 5, (12), 1551-1556.
- ²⁰ Hanks, S. K.; Quinn, A.M.; Hunter, T. *Science*. **1988**, 241, (4861), 42-52.
- ²¹ Taylor, S.S.; Kim, C.; Cheng, C.Y.; Brown, S.H.J.; Wu, H.; Kannan, N. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. **2008**, 1784, (1), 16-26.
- ²² Martin-Lomas, M.; Nieto, P.M.; Khiar, N.; Garcia, S.; Flores-Mosquera, M.; Poirot, E.; Angulo, J.; Munoz, J.L. *Tetrahedron-Asymmetr*. **2000**, 11, (1), 37-51.
- ²³ Dietrich, H.; Espinosa, J. F.; Chiara, J.L.; Jimenez-Barbero, J.; Leon, Y.; Varela-Nieto, I.; Mato, J.M.; Cano, F.H.; Foces-Foces, C.; Martin-Lomas, M. *Chem-Eur. J*. **1999**, 5, (1), 320-336.
- ²⁴ Lopez-Prados, J.; Cuevas, F.; Reichardt, N.C.; de Paz, J.L.; Morales, E.Q.; Martin-Lomas, M. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2005**, 3, (5), 764-786.
- ²⁵ Hunenberger, P.H.; Helms, V.; Narayana, N.; Taylor, S.S.; McCammon, J.A. *Biochemistry*. **1999**, 38, (8), 2358-2366.
- ²⁶ Narayana, N.; Diller, T.C.; Koide, K.; Bunnage, M.E.; Nicolaou, K.C.; Brunton, L. L.; Xuong, N.H.; Ten Eyck, L.F.; Taylor, S.S. *Biochemistry*. **1999**, 38, (8), 2367-2376.
- ²⁷ a) Chen, H.-C.; Van Patten, S.M.; Smith, A.J.; Walsh, D.A. *Biochem. J*. **1985**, 231, 655-661. b) Blundell, T.L.; Sobanda, D.L.; Sternberg, M.J.E.; Trotón, J.M. *Nature*. **1987**, 326, 347-352. c) Goodsell, D.S.; Olson, A.J. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **1990**, 8, 195-202. d) Goodsell, D.S.; Lauble, H.; Stout; C.D.; Olson, A.J. *Proteins*. **1993**, 17, 1-10.
- ²⁸ a) Goodsell, D.S.; Morris, G.M.; Olson, A.J. *J. Mol. Recognit*. **1996**, 9, 1-5. b) Lauble, H. ; Scout, C.D. ; Olson, A.J. *Proteins*. **1993**, 17, 1-10.
- ²⁹ Lopez-Prados, J. *Inositolfosfoglicanos: Síntesis, Estructura Y Actividad Biológica* Universidad de Sevilla, Sevilla, **2005**.
- ³⁰ Lopez-Prados, J.; Martin-Lomas, M. *J. Carbohydr. Chem*. **2005**, 24, (4-6), 393-414.
- ³¹ Homans, S.W. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp*. **1990**, 22, 55-81.
- ³² Homans, S.W., ¹H NMR studies od oligosaccharides. In *NMR of Macromolecules. A Practical Approach*, K., R. G. C., Ed. Oxford University Press: Oxford, **1993**; pp 189-314.
- ³³ Poveda, A.; Jimenez-Barbero, J. *Chem. Soc. Rev*. **1998**, 27, (2), 133-143.
- ³⁴ Bush, C.A.; Martin-Pastor, M.; Imberty, A. *Annu. Rev. Bioph. Biom*. **1999**, 28, 1-269.
- ³⁵ Duus, J.O.; Gotfredsen, C.H.; Bock, K. *Chem. Rev*. **2000**, 100, (12), 4589-4614.
- ³⁶ Imberty, A.; Perez, S. *Chem. Rev*. **2000**, 100, (12), 4567-4588.
- ³⁷ a) Rance, M.; Sørensen, O.W.; Bodenhausen, G.; Wagner, G.; Ernst, R.R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1983**, 117, 479-485. b) Piantini, U.;

- Sørensen, O.W.; Ernst, R.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6800-6801. c) Davis, A.L.; Laue, E.D.; Keeler, J.; Moskau, D.; Lohman, J. *J. Magn. Reson.* **1991**, 94, 637-644.
- ³⁸ a) Braunschweiler, L.; Ernst, R.R.; *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521-528. b) Bax, A.D. Davis, G.; *J. Magn. Reson.* **1985**, 65, 355-360. c) Bax, A.; *Methods Enzymol.* **1989**, 176, 151-168.
- ³⁹ Jeener, J.; Meier, B.H.; Bachmann, P.; Ernst, R.R.; *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4546-4553.
- ⁴⁰ a) Marion, D.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 95, 1. b) Müller, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4481-4484. c) Willker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bermel, W. *J. Magn. Reson.* **1993**, 31, 287-292.
- ⁴¹ a) von der Lieth, C.-W.; Kozar, T.; Hull, W.E. *J. Mol. Struct.* **1997**, 395-396, 225-244. b) Pérez, S.; Imbert, A.; Engelsens, S.B.; Gruza, J.; Mazeau, K.; Jiménez-Barbero, J.; Poveda, A.; Espinosa, J.-F.; van Eyck, B.P.; Johnson, G.; French, A.D.; Kouwijzer, M.L.C.E.; Grootenuis, P.D.J.; Bernardi, A.; Raimondi, L.; Senderowitz, H.; Durier, V.; Vergoten, G.; Rasmussen, K. *Carbohydr. Res.* **1998**, 314, 141-155.
- ⁴² Mohamadi, F.; Richards, N.G.J.; Guida, W.C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caulfield, C.; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W.C. *J. Comp. Chem.* **1990**, 11, 440-467
- ⁴³ Senderowitz, H.; Still, W.C. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1427.
- ⁴⁴ Edinger, S.R.; Cortis, C.; Shenkin, P.S.; Friesner, R.A. *J. Phys. Chem B.* **1997**, 101, 1190-1197.
- ⁴⁵ a) Friedrich, R.; Siegert, S.; Peinke, J.; Lück, St.; Siefert, M.; Lindemann, M.; Raethjen, J.; Deuschl, G.; Pfieter, G. *Phys. Lett. A.* **2000**, 271, 217. b) Renner, Ch.; Peinke, J.; Friedrich, R. *Physica A.* **2001**, 298, 499 c) Renner, Ch.; Peinke, J.; Friedrich, R. *J. Fluid Mech.* **2001**, 433, 383 d) Siegert, S.; Friedrich, R.; Peinke, J. *Phys. Lett. A.* **1998**, 234, 275-280.
- ⁴⁶ a) Homans, S.W.; Forster, M. *Glycobiology.* **1992**, 2, 143. b) Rutherford, T.J.; Partridge, J.; Weller, C.T.; Homans, S.W. *Biochemistry.* **1993**, 32, 12715. c) Rutherford, T.J.; Spackman, D.G.; Simpson, P.J.; Homans, S.W. *Glycobiology.* **1994**, 4, 59.
- ⁴⁷ De Leeuw, S.W.; Perram, J.W.; Smith, E.R. *Proc. R. Soc. Lond. A.* **1980**, 373, 27-56.
- ⁴⁸ Bayly, C.I.; Cieplak, P.; Cornell, W.D.; Kollman, P.A. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 10269.
- ⁴⁹ Woods, R.J.; Pathiasderil, A.; Wormald, M.R.; Edge, C.J.; Dwek, R.A. *Eur. J. Biochem.* **1998**, 258, 372-386.
- ⁵⁰ Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Kollman, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9620.
- ⁵¹ Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.G.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Keith, T.; Petersson, G.A.; Montgomery, J.A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, M.A.; Zakrzewski, V.G.; Ortiz, J.V.; Foresman, J.B.;

Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Peng, C.Y.; Ayala, P.Y.; Chen, W.; Wong, M.W.; Andres, J.L.; Replogle, E.S.; Gomperts, R.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Binkley, J.S.; Defrees, D.J.; Baker, J.; Stewart, J.P.; Head-Gordon, M.; Gonzalez, C.; Pople, J.A.; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1994**.

⁵² Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Zakrzewski, V.G.; Montgomery Jr, J.A.; Stratmann, R.E.; Burant, J.C.; Dapprich, S.; Millam, J.M.; Daniels, A.D.; Kudin, K.N.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G.A.; Ayala, P.Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J.V.; Baboul, A.G.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Andres, J.L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E.S.; Pople, J.A. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1998**.

⁵³ a) Jiménez-Barbero, J.; Peters, T. *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*, Wiley-VCH, **2003**, ISBN: 3-527-30414-2. b) Kessler, H.; Seip, S. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists*. (Eds: W.R. Croasmun, R.M K. Carlson), VCH Publishers, New York-Weinheim, **1994**, 619-654. c) Dyson, H.J.; Wright P.E. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists*. (Eds: W. R. Croasmun, R.M K. Carlson), VCH Publishers, New York-Weinheim, **1994**, 655-698.

⁵⁴ a) Siebert, H.-C. ; Franck, M.; von der Lieth, C.-W.; Jiménez-Barbero, J. ; Gabius. H.-J. (edit: J. Jiménez-Barbero, T. Peters), *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*, Wiley-VCH, **2003**, 39-57.

⁵⁵ Adams. B.; Lerner, L.E. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, 32, 225.

⁵⁶ Leeftang, B.R.; Vliegthart, J.F.G.; Kroon-Batenburg, L.M.J.; van Eijck, B.P.; Kroon, J. *Carbohydr. Res.* **1992**, 230, 41-61.

⁵⁷ Sandström, C.; Baumann, H.; Kenne, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, 2, 2385-2393.

⁵⁸ a) Poppe, L.; van Halbeek, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 363. b) van Halbeek, H.; Poppe, L. *Magn. Reson. Chem.* **1992**, 30, S74. c) Poppe, L.; van Halbeek, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1092. d) Poppe, L.; Stuike-Prill R.; Mayer, B.; van Halbeek, H. *J. Biomol. NMR.* **1992**, 2, 109.

⁵⁹ a) Hoult, D.I. *J. Magn. Reson.* **1976**, 21, 337. b) Zuiderweg, E.R.P. *J. Magn. Reson.* **1986**, 70, 336.

⁶⁰ Plateau, P.; Guéon, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7310.

⁶¹ Leeftang, B.R.; Vliegthart, J.F. *J. Magn. Reson.* **1990**, 89, 615-619.

⁶² a) Sklenar, V.; Bax, A. *FEBS Letters.* **1987**, 216, 249. b) Bodenhausen, G.; Freeman, R.; Turner, D.L. *J. Magn. Reson.* **1977**, 27, 511.

- ⁶³ Sklenar, V.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1987**, 75, 378. b) Canet, D.; Boulot, D.; Brondeau, J. *J. Magn. Reson.* **1988**, 79, 377. c) Mecerle, B.; G. Wider, Otting, G.; Weber, C.; Wuthrich, K. *J. Magn. Reson.* **1989**, 85, 608. d) Otting, G.; Wuthrich, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 1870.
- ⁶⁴ a) Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR.* **1992**, 2, 661. b) Sklenar, V.; Piotto, M.; Leppik, R.; Saudek, V. *J. Magn. Reson. A.* **1993**, 102, 241.
- ⁶⁵ a) Hwang, T.-L.; Shaka, A.J. *J. Magn. Reson.* **1995**, 112, 275. b) Emetarom, C.; Hwang, T.-L.; Mackin, G.; Shaka, A.J. *J. Magn. Reson.* **1995**, 115, 137. c) Mackin, G.; Shaka, A.J. *J. Magn. Reson.* **1996**, 118, 247. d) Heikkinen, S.; Rahkamaa, E.; Kilpeläinen, I. *J. Magn. Reson.* **1997**, 127, 80-86. e). Heikkinen, S.; Rahkamaa, E.; Kilpeläinen, I. *J. Magn. Reson.* **1998**, 133, 183-189.
- ⁶⁶ Poppe, L.; van Halbeek, H. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 215-216.
- ⁶⁷ Adams, B.; Lerner, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4827-4829.
- ⁶⁸ Casu, B.; Reggiani, M.; Gallo, G.G.; Vigevani, A. *Tetrahedron.* **1966**, 22, 3061-3083. b) Vaisman, I.-I.; Berkowitz, M.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7889-7896. c) Borin, I.A.; Skaf, M.S. *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 6412-6420. d) Kirchner, B.; Reiher, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6206-6215.
- ⁶⁹ a) Angell, C.A. *In water: a comprehensive Treatise*, F. Frank (Ed.) Plenum Press: New York, **1982**, Vol 7, 1-82. b) F. Franks, *In water: a comprehensive Treatise*, F. Frank (Ed.) Plenum Press: New York, **1982**, Vol 7, 215-334. c) Skalicky, J.J.; Sukumaran, D.K.; Mills, J.L.; Szyperski, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3230-3231. d) Tjandra, N.; Bax, A. *Science.* **1997**, 278, 1111-1114. e) Prestegard, J.H.; *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 517-522.
- ⁷⁰ a) Poppe, L.; van Halbeek, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 363. b) Leeftang, B.R.; Vliegthart, J.F.K. *J. Magn. Reson.* **1990**, 89, 615.
- ⁷¹ a) Poppe, L.; van Halbeek, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1092-1094. b) Adams, B.; Lerner, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4827-4829. c) Sheng, S.; van Halbeek, H. *Biochem. Bioph. Res. Com.* **1995**, Vol 215, 2, 504-510. d) Batta, G.; Kövér, K.E. *Carbohydr. Res.* **1999**, 320, 267-272. e) Bekiroglu, S.; Sandström, C.; Norberg, T.; Kenne, L. *Carbohydr. Res.* **2000**, 328, 409-418.
- ⁷² Sandström, C.; Baumann, H.; Kenne, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, 2, 809-815.

CAPITULO 4

PARTE EXPERIMENTAL.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

Los espectros de RMN se han registrado en el espectrómetro Bruker AVANCE 500 DPX del servicio de RMN del Centro de Investigaciones Químicas Isla de la Cartuja.

Los espectros han sido asignados utilizando técnicas bidimensionales convencionales, COSY,² TOCSY,³ NOESY⁴, ROESY,⁵ y HMQC⁶ o HSQC⁷,

La concentración de las muestras de oligosacáridos para RMN, estuvo siempre en el entorno de 3-1 mM (disueltos en 600-500 µL de disolvente). Las muestras se liofilizaron al menos 3 veces con D₂O, y posteriormente se disolvieron en D₂O del 99.97 %D (euriso-top®). El valor de pH* se ajustó en todos los casos mediante adición de pequeñas cantidades de DCl o NaOH (referencia). Todos los espectros de RMN se registraron en D₂O a 25° C, salvo en casos concretos en los que se especifique otra temperatura, en espectrómetros Bruker AVANCE DRX-500 (sonda de detección inversa de 5mm doble ¹H/Banda-ancha, con gradientes en Z), y

² Griesinger, C.; Sørensen, O.W.; Ernst, R.R. *J. Magn. Reson.* **1987**, 75, (3), 474-492. b) Mueller, L. *J. Magn. Reson.* **1987**, 72, (1), 191-196. c) Kim, Y.; Prestegard, J.H. *J. Magn. Reson.* **1989**, 84, (1), 9-13.

³ a) Braunschweiler, L.; Ernst, R.R.; *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521-528. b) Bax, A.D. Davis, G.; *J. Magn. Reson.* **1985**, 65, 355-360. c) Bax, A.; *Methods Enzymol.* **1989**, 176, 151-168

⁴ Jeener, J.; Meier, B.H.; Bachmann, P.; Ernst, R.R.; *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4546-4553.

⁵ a) Farmer, B. T.; Macura, S.; Brown, L. R. *J. Magn. Reson.* **1987**, 72, 2, 347-352. b) Bull. T.E. *J. Magn. Reson.* **1988**, 80, (3), 470-481. c) Poppe, L.; van Halbeek. H. *J. Magn. Reson.* **1992**, 96, (1), 185-190.

⁶ a) Kessler, H.; Schmieder, P.; Kurz, M. *J. Magn. Reson.* **1989**, 85, (2), 400-405. b) Crouch, R.C.; McFadyen, R.B.; Daluge, S.M.; Martin, G.E. *Magn. Reson. Chem.* **1990**, 28, (9), 792-796.

⁷ a) Marion, D.; Wüethrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 95, 1. b) Müller, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4481-4484. c) Willker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bermel, W. *J. Magn. Reson.* **1993**, 31, 287-292.

Bruker AVANCE DRX-400 (sonda directa 5mm QNP). Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) respecto a la frecuencia de resonancia del DSS como referencia primaria, aunque la calibración de los desplazamientos químicos se realizó a partir de la frecuencia base absoluta del núcleo correspondiente y la relación de frecuencias, de acuerdo con el software del fabricante.

Los experimentos 2D DQF-COSY⁸, TOCSY, NOESY, ROESY y TROESY⁹ se registraron en el modo sensible a la fase con el método TPPI (Time Proportional Phase Increment) para la detección en cuadratura en F1. Los experimentos HMQC se llevaron a cabo en modo magnitud, y los experimentos HSQC en el modo sensible a la fase con detección “eco-antieco”. Para los espectros COSY, NOESY HMQC, y HSQC, se utilizaron programas de pulsos con gradientes en Z para selección o purga.

En los experimentos DQF-COSY se utilizaron típicamente matrices de datos de 4 K x 1 K, para anchuras espectrales de 5000 Hz, y 16-32 acumulaciones por incremento, dependiendo de la muestra. Se aplicaron funciones sen^2x desplazadas, en ambas dimensiones, y se aplicó *zero-filling* en F1 para aumentar la resolución digital expandiendo los datos a una matriz de 8 K x 2 K. Esta importante expansión de los datos confiere mayor precisión en la obtención de las constantes $^3J_{H,H}$ por desconvolución recursiva en el dominio de frecuencias de los picos de cruce. Para tal efecto se hizo uso del programa DECO implementado en el programa de procesamiento de RMN XWINNMR. Las constantes de acoplamiento teóricas se

⁸ a) Rance, M.; Sørensen, O.W.; Bodenhausen, G.; Wagner, G.; Ernst, R.R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 117, 479-485. b) Piantini, U.; Sørensen, O.W.; Ernst, R.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6800-6801. c) Davis, A.L.; Laue, E.D.; Keeler, J.; Moskau, D.; Lohman, J. *J. Magn. Reson.* **1991**, 94, 637-644.

⁹ a) Brüschweiler, R.; Griesinger, C.; Ernst, R.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, (20), 8034-8035. b) Brüschweiler, R. *Structural dynamics in biomolecules monitored by nuclear magnetic resonance relaxation* (Doctoral dissertation, Diss. Naturwiss. ETH Zürich, Nr. 9466, **1991**). c) Hwang, T.L., Shaka, A.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, (8), 3157-3159.

obtuvieron por aplicación de las ecuaciones tipo Karplus modificadas por Haasnoot *et al.*¹⁰; **Error! Marcador no definido.** implementadas en Macromodel 6.0.

Las constantes de acoplamiento interprotónicas fueron obtenidas por medida directa del desdoblamiento cuando fue posible ó por desconvolución de los picos en antifase en los experimentos DQF-COSY (*Double-Quantum Filtered Correlation Spectroscopy*).¹¹

Para los experimentos TOCSY, se utilizaron generalmente matrices de datos de 2 K x 256-300, y 32 acumulaciones por incremento, dependiendo de la muestra. Se utilizó la secuencia MLEV-17 con 60 ms como período de mezcla isotrópica. Para mejorar la resolución se aplicaron funciones sen^2x desplazadas, y predicción lineal en la dimensión F1. Los experimentos 2D-NOESY se registraron a diferentes tiempos de mezcla 200 y 600 ms (típicamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, y 600 ms) empleando matrices de datos de 2K x 300, y fueron procesados aplicando funciones sen^2x desplazadas y *zero-filling* durante la transformación.

Los experimentos de correlación ^1H - ^{13}C a un enlace se llevaron a cabo mediante secuencias HMQC o HSQC. En todos los casos se adquirió una matriz de datos de 1 K x 256 para resolver anchuras espectrales de 5000 Hz y 12600 Hz en F2 y F1, respectivamente, realizando 16 acumulaciones por incremento. Se aplicaron funciones sen^2x con valores de desplazamiento (SSB) de 2.2 (F2) y 3.5 (F1), se completó con ceros hasta una matriz final de 1K x 1K y se empleó predicción lineal en la dimensión F1.

Para la evolución de las constantes de velocidad de relajación cruzada, σ^{NOE} , σ^{ROE} , $\sigma^{\text{T-ROE}}$, se emplearon siempre que fue posible experimentos 1D selectivos basados en el doble eco de espín propuesto por Shaka (dpfgse: double pulsed field

¹⁰ Haasnoot, C.A.G.; de Leeuw, F.A.A.M.; Altona, C. *Tetrahedron*. **1980**, 36, (19), 2783–2792. b) Haasnoot, C.A.G.; De Leeuw, F.A.A.M.; Altona, C. *Bull. Soc. Chim. Belges*, **1980**, 89, 125–131.

¹¹ a) Cavanagh, J.; Waltho, J. P.; Keeler, J. *J. Magn. Reson.* **1987**, 74, (2), 386-393. b) Pons, M.; Feliz, M.; Giralt, E. *J. Magn. Reson.* **1988**, 78, (2), 314-320. c) Derome, A.E; Williamson, M. P. *J. Magn. Reson.* **1990**, 88, (1), 177-185.

gradients spin echo). En el caso de los experimentos NOESY se empleó un esquema en esencia similar al propuesto por Keeler y Shaka que incluye gradientes bipolares en el tiempo de mezcla para disminuir posibles interferencias de mecanismos no deseados.

Para verificar la linealidad del crecimiento en el rango de tiempo de mezcla considerado, se representaron las curvas del volumen normalizado para cada tiempo de mezcla $(V_{ij}/V_{diag})_{t=t}$ frente al tiempo de mezcla. Una vez comprobado, se obtuvieron las constantes de velocidad de relajación cruzada, σ , como la velocidad inicial de crecimiento del NOE, ROE o TROE calculada por extrapolación a tiempo de mezcla cero de la relación lineal $(V_{ij}/[V_{diag} \cdot t_m])$ vs. t_m , donde V_{ij} , $V_{diag.}$ y t_m , son los volúmenes de los picos de cruce y diagonal, y el tiempo de mezcla, respectivamente¹².

Observación de protones lábiles.

La concentración de las muestras empleadas fue similar a la de los estudios en D₂O, salvo en el caso de los experimentos sobre sacarosa en los que se varió entre 2 y 20mM. También se evaluaron tubos de RMN no convencionales de 1.5 mm que permitieron aumentar la concentración hasta 10 mM. Los tubos de RMN fueron tratados previamente con tampón fosfato a pH neutro o con Cloruro de TMS para evitar interferencias de la superficie del vidrio.^{13, 14} Se emplearon como disolvente mezclas H₂O/D₂O (90:10), agua / DMSO y agua / acetona en varias proporciones, siendo la optima agua / acetona 85:15 a temperaturas entre 5 y -17C. Los experimentos monodimensionales se registraron empleando los métodos watergate, original o empleando los trenes de pulsos 3-9-19, W3, W4 y W5,¹⁵ o excitation

¹² van Halbeek, H.; Poppe, L. *Magn. Reson. Chem.* **1992**, 30, 74-86.

¹³ Sandström, C.; Baumann, H.; Kenne, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, 2, 809-815.

¹⁴ Bekiroglu, S.; Sandström, C.; Norberg, T.; Kenne, L. *Carbohydr. Res.* **2000**, 328, 409-418.

¹⁵ a) Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR.* **1992**, 2, 661. b) Sklenar, V.; Piotto, M.; Leppik, R.; Saudek, V. *J. Magn. Reson. A.* **1993**, 102, 241.

sculpting¹⁶. Para los experimentos bidimensionales TOCSY (15-60 ms de tiempo de mezcla), NOESY o ROESY se emplearon siempre implementaciones del watergate basadas en el tren 3-9-19 sobre los programas de pulsos empleados anteriormente. El resto de las condiciones experimentales: tipo de adquisición, opciones de transformación etc. fueron, en esencia, similares a las descritas para los experimentos en D₂O.

Finalmente, las condiciones optimas encontradas para la de preparación de las muestras fueron: el empleo de agua y acetona (85:15) como disolvente, a pH de 7,17 para **22** y de 7,12 para **23** y una temperatura entre 0°C hasta -15°C. Aunque se había descrito la utilización de resinas de intercambio iónico para eliminar posibles trazas de las impurezas iónicas que catalizan el intercambio. En nuestro caso, debido a la presencia de grupos cargados fosfato y amino en los pseudotrisacaridos **25** y **26** se efectuó la purificación previa empleando cromatografía en fase reversa.

Valoraciones ácido-base.

Las muestras empleadas en los experimentos de valoración fueron las mismas que se usaron en el resto de los experimentos salvo que se empleó acetona (3-5 µL) como referencia interna. El pH* se varió añadiendo pequeñas cantidades de NaOD, o DCl, y se midió después de la medida empleando un pHmetro sin calibración especial para corregir los efectos isotópicos del deuterio.

¹⁶ a) Hwang, T.-L.; Shaka, A.J. *J. Magn. Reson.* **1995**, 112, 275. b) Emetarom, C.; Hwang, T.-L.; Mackin, G.; Shaka, A.J. *J. Magn. Reson.* **1995**, 115, 137. c) Mackin, G.; Shaka, A.J. *J. Magn. Reson.* **1996**, 118, 247. d) Heikkinen, S.; Rahkamaa, E.; Kilpeläinen, I. *J. Magn. Reson.* **1997**, 127, 80-86. e) Heikkinen, S.; Rahkamaa, E.; Kilpeläinen, I. *J. Magn. Reson.* **1998**, 133, 183-189.

4.2.- CÁLCULOS TEÓRICOS.

Los ángulos de torsión han sido definidos como: $\Phi = \text{H1-C1-O1-Cx}$, $\Psi = \text{C1-O1-Cx-Hx}$, y $\omega = \text{H5-C5-C6-O6}$.

Mapas adiabáticos.

En el cálculo de los mapas adiabáticos se empleó el programa Macromodel 6.0 empleando el campo de fuerzas AMBER* con la adaptación de la parametrización de Homans o con la posterior de Stille empleando las cargas puntuales asignadas por el campo de fuerzas e incluyendo los efectos del disolvente empleando una constante dieléctrica de 80 ó el modelo continuo GB/SA. Las estructuras de partida se construyeron, en una primera etapa, manualmente y minimizaron exhaustivamente antes de comenzar la preparación de los mapas rígidos. En todas las minimizaciones se empleó el algoritmo de gradientes conjugados de Polar-Ribiere hasta cumplir el criterio de convergencia (derivadas de rmnd menores de 0.001 hJ/Åmol) hasta un máximo de 9999 iteraciones. Los mapas rígidos se construyeron variando los ángulos de torsión estudiados cada 20° en las estructuras de partida minimizadas. Para la generación de estos mapas se consideraron los tres posibles rotámetros del grupo hidroximetilo: *gg*, *gt*, *tg*; los dos posibles sentidos de las disposiciones cíclicas de los grupos hidroxilo secundarios: “clockwise” o “anticlockwise”. Los mapas relajados se construyeron por minimización de los correspondientes mapas rígidos, según las condiciones citadas manteniendo constante los ángulos torsiones evaluadas. Y finalmente, los mapas adiabáticos se construyeron empleando un programa desarrollado por Manuel Martín Pastor incluidos en NOEPROM de acuerdo con la siguiente expresión, que evalúa la probabilidad en el espacio:

$$P_{\Phi, \Psi} = \frac{\sum_i [\exp(-E_i / RT)]}{\sum_i \sum_{\Phi, \Psi} [\exp(-E_{i, \Phi, \Psi} / RT)]}$$

Las distancias interprotónicas sobre el espacio conformacional del mapa adiabático se calcularon como el promedio en $\langle r^{-6} \rangle$ pesado en la probabilidad de cada punto según:

$$\langle r^{-6} \rangle_{kl} = \left[\sum P_{kl} r_{kl}^{-6} \right]^{-1/6}$$

Simulaciones "in vacuo"

Para las dinámicas moleculares (newtonianas o estocásticas) se usó el programa Macromodel 6.0, y los mismos campos de fuerzas y asignaciones de cargas que las empleadas en el cálculo de los mapas adiabáticos. Tanto para las dinámicas con $\epsilon = 80$ como para aquellas con GB/SA el protocolo seguido fue el mismo. En primer lugar, la estructura de partida elegida sobre los mapas adiabáticos se sometió a una minimización energética en las condiciones habituales. Posteriormente, tras una fase de equilibración con una asignación de velocidades iniciales según una distribución de Maxwell-Boltzmann a 0K y calentamiento progresivo durante 100-500 ps, se realizó la etapa productiva a temperatura constante de 300K usando un tiempo de integración de 1.0 fs, actualizando la lista de pares de no-enlace cada 25 etapas de integración, con una la distancia límite para el truncado de estas interacciones (cutoff) de 10 Å, aplicando el algoritmo SHAKE para la restricción de los movimientos de alta frecuencia a los átomos de hidrógeno, y una constante de acoplamiento al baño térmico según el algoritmo de Berendsen de 0.5 ps (dinámicas newtonianas) o una constante de fricción de 2.5 ps (dinámicas estocásticas). Las estructuras intermedias fueron guardadas cada picosegundo. Las distancias promedio calculadas a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular fueron calculadas como $\langle r^{-6} \rangle$ según:

$$\langle r^{-6} \rangle_{kl} = \left[\sum (1/n) r_{kl}^{-6} \right]^{-1/6}$$

Simulaciones con disolvente explícito

Para las simulaciones en presencia de disolvente explícito se empleó el programa AMBER 6.0¹⁷ empleando el campo de fuerzas GLYCAM. Los distintos tipos de residuos se construyeron manualmente y se incluyeron en la librería de residuos de AMBER con el módulo PREP, modificando convenientemente los tipos de átomos para compatibilizarlos con las definiciones del campo de fuerzas AMBER-GLYCAM. Se calcularon las cargas puntuales para estos compuestos empleando GAUSSIAN 94¹⁸ ó 98¹⁹, con el nivel de cálculo HF/6-31G* según el método RESP (*Restrained ElectroStatic Potencial fit*).²⁰

Las estructuras de partida se sometieron a una minimización "in vacuo", para eliminar malos contactos iniciales. Esta minimización consistió en 200 etapas de "descenso pronunciado" seguido por minimización con "gradientes conjugados"

¹⁷ Case, D.A.; Pearlman, D.A.; Caldwell, J.W.; Cheatham III, T.E.; Ross, W.S.; Simmerling, C.L.; Kollman, P.A. *AMBER 6*. University of California, San Francisco, 119. **1999**.

¹⁸ Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.G.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Keith, T.; Petersson, G.A.; Montgomery, J.A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, M.A.; Zakrzewski, V.G.; Ortiz, J.V.; Foresman, J.B.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Peng, C.Y.; Ayala, P. Y.; Chen, W.; Wong, M.W.; Andres, J.L.; Replogle, E.S.; Gomperts, R.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Binkley, J.S.; Defrees, D.J.; Baker, J.; Stewart, J.P.; Head-Gordon, M.; Gonzalez, C.; Pople, J.A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1995**.

¹⁹ Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Zakrzewski, V.G.; Montgomery Jr, J.A.; Stratmann, R.E.; Burant, J.C.; Dapprich, S.; Millam, J.M.; Daniels, A.D.; Kudin, K.N.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G.A.; Ayala, P.Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J.V.; Baboul, A.G.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Andres, J.L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E.S.; Pople, J.A. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1998**.

²⁰ Bayly, C.I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P.A. *J. Phys. Chem-Us*. **1993**, 97, (40), 10269-10280.

hasta que el gradiente energético fue inferior a $0.01 \text{ Kcal/mol}\cdot\text{\AA}$ empleando un constante dieléctrica utilizada fue $\epsilon = 5\cdot r$, con un cutoff de 10 \AA . Las estructuras minimizadas "sumergieron" en cajas de moléculas de agua TIP3P empleando el módulo Xleap. En todas las simulaciones se hizo uso de condiciones de contorno periódicas (PBC).

El período de equilibración se inició con 100 ciclos de minimización con "descenso pronunciado" seguido por una minimización completa con "gradientes conjugados" hasta que el gradiente fue $< 0.01 \text{ Kcal/mol}\cdot\text{\AA}$, manteniendo las posiciones del soluto fijadas con una constante de $1000 \text{ Kcal/mol}\cdot\text{\AA}^2$. Tras esta etapa se llevaron a cabo 25 ps de dinámica molecular en el colectivo isotérmico-isobárico NPT, una vez más con las posiciones del soluto fijadas, asignando las velocidades iniciales por medio de una distribución de Maxwell a 298 K. Esta simulación permite la equilibración de la densidad del sistema, en torno al valor de 1 g/cm^3 , eliminando las posibles "burbujas" que se pueden originar como consecuencia de imperfecciones en el algoritmo de inmersión del soluto en la caja. Este período de equilibración fue seguido por varios nanosegundos de dinámica "productiva" en el colectivo NVT. Las coordenadas del sistema se guardaron en el fichero de trayectoria cada 0.5 ps. El análisis de los datos resultantes de las dinámicas moleculares se llevó a cabo a través del módulo CARNAL incluido en el paquete AMBER (5.0 y 6.0). Para el procesado gráfico de los resultados se hizo uso del programa Microcal Origin 5.0 <http://www.microcal.com>

APENDICE 1: ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PARAMETRIZACIONES PARA CARBOHIDRATOS DEL CAMPO DE FUERZAS AMBER.

Con el fin de realizar un estudio comparativo de estas dos parametrizaciones incluidas dentro del campo de fuerzas AMBER*, se evaluaron su rendimiento y precisión con los compuestos **1** y **2**, que habían sido previamente analizadas en nuestro grupo, de las que existían datos experimentales y representaban un caso especialmente exigente. Para ello se calcularon los correspondientes mapas de energía relajados y adiabáticos (Figuras 1 y 2). Para valorar la calidad de las simulaciones, se han contrastado las distancias experimentales con las teoricas que fueron calculadas como promedio ponderado en la población de $\langle r^{-6} \rangle$ sobre todo el espacio conformacional.

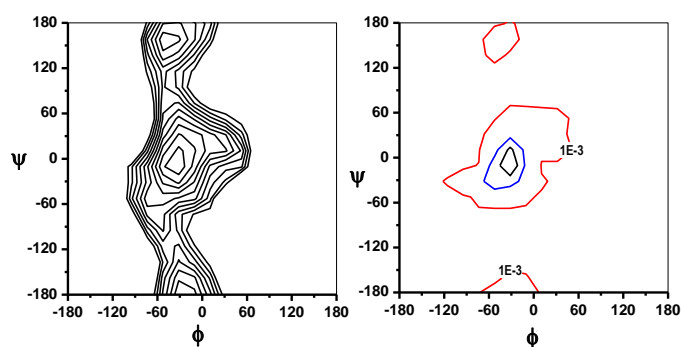


Figura 1. Mapas adiabáticos del compuesto **2** mediante campo de fuerzas AMBER* y con parametrización de Senderowitz-Parish-Still. Las cotas de energía se representan cada 3 kJ/Mol para el diagrama de energía y cada 10, 5.5 y 0.1% para las representaciones de probabilidad.

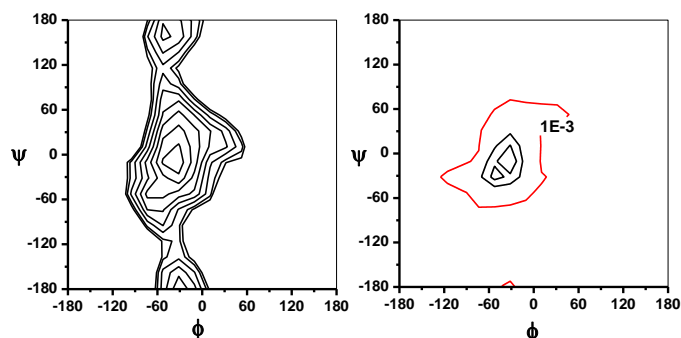


Figura 2. Mapas adiabáticos del compuesto **2** mediante campo de fuerzas AMBER* y con parametrización de Homans. Las cotas de energía se representan cada 3 kJ/Mol para el diagrama de energía y cada 0.1, 5.5 y 10 % para las representaciones de probabilidad.

En el caso del compuesto **1** (mapas no mostrados), la interacción fosfato – amonio provoca que el compuesto únicamente presente una conformación de tipo *syn-Ψ*. En este caso ambos tipos de parametrizaciones dan resultados en razonable acuerdo con los experimentales. Sin embargo, los datos experimentales para el compuesto **2** indican que en este caso coexiste una población detectable por RMN de la conformación *anti-Ψ*. En el estudio previo que realizó nuestro grupo se pudo simular esta situación apropiadamente empleando el campo AMBER implementado en Insignth-II. En cambio, para la formulación del mismo campo de fuerzas en Macromodel aunque los mapas predicen un mínimo local de tipo *anti-Ψ* cualitativamente subestiman su población. En este punto se aprecia una diferencia entre las dos parametrizaciones estudiadas, y la versión de Senderowitz et al. atribuye un mayor peso a la geometría *anti*

Apéndice 2.- Valoraciones ácido-base

Como se ha comentado en el apartado de materiales y métodos el pH al que se registraron los espectros fue optimizado. En primer lugar para evitar la coexistencia de especies con distinto grado de ionización en la muestra. En segundo lugar, puesto que las señales mostraron una severa dependencia del estado de ionización de los grupos amino y fosfato, para evitar solapamientos indeseados y formas de línea desfavorables.

Los valores de pKa correspondientes al grupo amino de la hexosamina se calcularon registrando la variación de desplazamiento químico en función del pH para todas las señales observables. La representación de $\Delta\delta$ frente al pH (Figura 1) permitió calcular los correspondientes pKa se se recogen en la tabla 1.

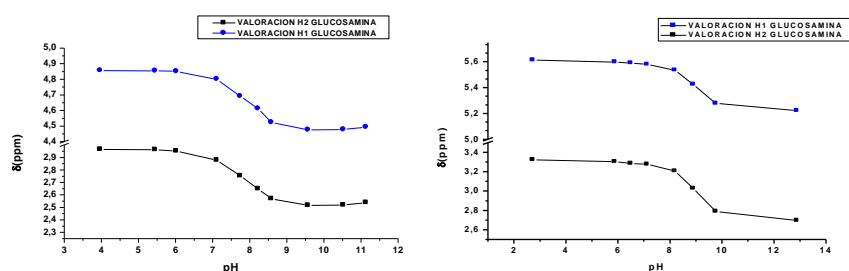


Figura 1. Curvas de valoración, realizadas para el compuesto **9** (izda) y **10** (derecha), a diferentes pH. El punto medio de la curva con un ajuste de tipo sigmoidal (Boltzmann) es por definición donde $pK_a = pH$.

Tabla 1. Valores de pKa obtenidos para los disacáridos **9-20**, tras experimentos de valoración por RMN.

Protón	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20
H1 GlcN	8,15	8,95	7,87	7,75	7,67	7,94	7,5	7,97	7,41	7,48	7,12
H2 GlcN	8,15	8,97	7,77	7,79	7,66	7,77	7,52	7,88		7,57	7,43
H3 GlcN		8,60									
H4 GlcN		9,03									
H5 GlcN		7,40									
H6 GlcN		8,37							7,31		
H1 mio-Ins				7,76	7,57		7,39	6,88	7,96	7,50	7,67
H2 mio-Ins		6,85			7,34						
H3 mio-Ins		9,03							7,42		
H4 mio-Ins		8,81						4,67			
H5 mio-Ins								7,33			
H6 mio-Ins				7,57	7,68					7,46	7,43
Promedio	8,15	8,96	7,82	7,77	7,67	7,86	7,51	7,93	7,41	7,53	7,28
P					7,38	4,03	7,49				

Tabla 2. Valores de pKa obtenidos para los disacáridos **22-27**, tras experimentos de valoración por RMN.

Protón	22	23	24	25	26	27
H1''	8,476	8,195	8,779			
H2''	8,434	8,195				
H3''						
H4''		8,342				
H5''	8,623					
H6''						
H1Nglc			6,291	5,190 8,973	5,246 8,569	6,352 8,563
H2Nglc				5,192 9,018	5,381 8,571	7,407 8,545
H3Nglc				5,166 8,943		
H4Nglc				5,113 8,914	5,189 9,136	
H5Nglc						
H6Nglc						

Los pKa de los disacáridos **9-17**, salvo **10**, oscilan en menos de una unidad de pH entre 8,15 y 7,28. Este valor que sería el esperado para un grupo amino indica la ausencia de alguna interacción estabilizante con otro grupo de la molécula

Resulta destacable que para el caso de los trisacáridos **22-24**, se observa un aumento del pH al aumentar el número de grupos fosfato en la estructura, respecto al protón anomérico H1''.

En los disacáridos fosfato **25-27**, con el grupo fosfato en la posición de glucosamina, se accede a observar los dos saltos producidos en la curva de ajuste pH vs $\Delta\epsilon$, correspondientes a los valores de ionización de los grupos amino. En los otros compuestos este salto no podía observarse debido seguramente a la naturaleza de los residuos.

La presente tesis dió lugar a las siguientes publicaciones:

1. **The solution conformation of glycosyl inositols related to inositolphosphoglycan (IPG) mediators.** M. Martín-Lomas, P. M. Nieto, N. Khair, S. García, M. Flores-Mosquera, E. Poirot, J. Angulo, J. L. Muñoz., *Tetrahedron Asymmetry*, **11**, (2000), 37-51. ISSN=0957-4166.
2. **Conformational aspects of the interaction of synthetically-prepared carbohydrate analogues with glycosidase enzymes.** J. Jiménez-Barbero, J. Cañada, J. F. Espinosa, E. Montero, J. L. García, J. L. Muñoz, *Research Advances in Organic Chemistry*, **1**, (2000), 13-26, Global Research Network, Editor R. M. Mohan.
3. **Synthesis and structure of 1-D-6-O-(2-Amino-2-deoxy- α and β -D-glucopyranosyl)-3-O-methyl-D-chiro-inositol.** Julia B. Bonilla, José L. Muñoz-Ponce, Pedro M. Nieto, M. Belén Cid, Noureddine Khair, Manuel Martín Lomas., *Eur. J. Org. Chem*; Issue 5, (2002). 889-898. ISSN=1434-193X.

